M. IONESCU-VARO

Biologie celulară

Editura didactică și pedagogică
București, 1976

Scanned with OKEN Scanner

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÂNTULUI

Prof. dr. doc. MIRCEA IONESCU-VARO

BIOLOGIE CELULARĂ

EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ
BUCUREȘTI

Scanned with OKEN Scanner

Control științific : Prof. dr. doc. **Ilie Diculescu** — I.M.F. București

Redactor : Prof. **D-tru Duțianu**

Tehnoredactor : **A. Daniel**

Grafician copertă : **N. Sîrbu**

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

Biologia celulară este ştiinţa care studiază structurile funcţionale şi fenomenele biologice generale, întîlnite la nivelul tuturor tipurilor de celule. Este un adevăr binecunoscut că „viaţa începe de la celulă" şi orice manifestare vitală are loc pe fundamentul organizării celulare, oricare ar fi gradul şi nivelul sistemului biologic. Indiferent că este vorba de nivelul organizării indivizilor, al populaţiilor (speciilor) sau biocenozelor, funcţionarea acestora este posibilă în primul rînd datorită organizării celulare a materiei vii. Celula, ca *numitor comun al materiei vii*, se defineşte ca fiind delimitată de o membrană semipermeabilă şi capabilă de autoreproducere conservativă, într-un mediu fără alte vieţuitoare. S-a dat această definiţie, pentru că virusii sînt şi ei individualităţi biologice, care nu au însă membrană semipermeabilă şi care sînt capabili de autoreproducere numai într-o celulă vie.

Mărimea celulelor este variată : de la „corpii elementari" ai bacteriilor mici, *Dialister pneumosintes* de 0,6 × 0,5 × 1 μ, şi pînă la gălbenuşul oului de struţ de 8,5 cm Ø, întîlnim o gamă largă de mărimi celulare.[1] Corpul omenesc, de pildă, este format din 2 000 miliarde de celule, fiecare în greutate medie de $\frac{100}{1\,000\,000}$ g. Analiza chimică a celulelor a evidenţiat în ele aceleaşi substanţe, dar în proporţii diferite : celulele animale cu 60% apă, 4,3% substanţe minerale, 6,2% glucide, 11,7% lipide, 17,8% proteine ; celule vegetale cu 75% apă, 25% substanţe minerale, 18% glucide, 0,5% lipide, 4% proteine. Oul amfibienilor, de o mărime în jur de 1,5 mm, conţine 57% apă, 2% substanţe minerale, 4% glucide, 11% lipide şi 27% proteine. Se remarcă faptul că oricît este de mare talia individului, mărimea medie a celulelor ţesuturilor sale este aceeaşi, ca şi la un individ mic din aceeaşi clasă. Talia individului este dată de numărul celulelor şi nu de mărimea lor. Legea lui H. Drisch postulează constanţa acestui număr de celule în cadrul fiecărui ţesut. Ţinem să subliniem că nu poate fi vorba de „celule singure", ci numai de celule diferenţiate în ţesuturi, fie că sînt vegetale sau animale. Ca o dovadă a originii unicelulare a organismelor pluricelulare sînt protistele — indivizi unicelulari — şi gameţii unicelulari ai plantelor şi animalelor.

Ceea ce găsim constant în fiecare celulă este *coexistenţa indisolubilă dintre nucleu şi citoplasmă*. Funcţiile lor sînt diferite, dar complemen-

[1] 1 nm = 1 000 microni (μ) ; 10 Å = 1 milimicron (mμ) ; 1 mμ = $\frac{1}{1\,000}$ μ ; 1 Å (Angström) = $\frac{1}{10\,000}$ μ.

Scanned with OKEN Scanner

tare. Nucleul, sau mai precis cistronii și genele ADN cromozomal, conține „memoria" genetică, care furnizează informațiile necesare atît pentru programul diferențierii celulare cît și pentru funcționarea celulei, transmițînd codificarea informațiilor de-a lungul generațiilor. Citoplasma, prin acizii săi ribonucleici (ARN), asigură „citirea" informațiilor în cadrul biosintezei proteinelor, iar prin activitatea sa metabolică furnizează compuși bogați în energie necesară manifestărilor vitale. De aceea, existența legăturii indisolubile dintre acidul dezoxiribonucleic cromozomal și citoplasmă, ca expresie a organizării fundamentale a materiei vii, este condiția necesară a vieții.

Celula, ca orice sistem biologic, are un caracter informațional și, din punct de vedere termodinamic, este un sistem deschis. Prin organizarea moleculară a plasmei, a membranelor intracelulare, a organitelor și a hialoplasmei, celulele se păstrează în stare de funcționare, se reproduc, își autoreglează întreaga activitate metabolică și se diferențiază în timp, dezvoltîndu-se de la forme simple spre forme complexe de organizare. Sintetizînd compuși cu un înalt potențial energetic celulele împiedică creșterea entropiei [1] determinînd scăderea acesteia. Celulele au, deci, o activitate antientropică. Celula, ca sistem cibernetic, răspunde la influența factorilor stimulanți, orientîndu-se în sensul contracarării variațiilor momentane ale acestor factori care acționează asupra ei. Răspunsurile, care bineînțeles au un caracter obiectiv-adecvat, finalizează funcționarea și structuralizarea celulară.

Din punct de vedere termodinamic, *celula este un sistem deschis.* Activitatea metabolică și reproducerea ei necesită un schimb permanent de energie și materie cu mediul extern. Pe de altă parte, menținerea vieții și creșterea celulară depind de un număr imens de reacții chimice. La *Escherichia coli* se cunosc circa 500 reacții chimice, iar la *Dialister* s-au evidențiat peste 1 500 de reacții. Astfel, ciclurile și diferitele căi metabolice ale căror etape sînt catalizate de enzime, ca și controlul activității acestora prin inhibiție, activare și retroacțiune, sînt reacții chimice neliniare. Dar în celule mai au loc o serie de fenomene de transport, ca trecerea facilitată a ionilor sau transportul activ, difuzia *t*-ARN în vecinătatea ribozomilor, ciclurile nictimerale etc., care se efectuează în etape neliniare. În fine, aportul de energie și de materie se face în condiții de neechilibru, deoarece produsele reacțiilor sînt fie eliminate din celula vie, fie transportate în diferite locuri din ea, unde îndeplinesc alte roluri. Acest schimb permanent și continuu de materie și energie cu mediul exterior are loc în condițiile cînd aprovizionarea din afară este asigurată din plin. Celula vie tinde mereu către un regim constant de activitate, care a fost denumit *stare staționară*, sau de *neechilibru.* Celula, ca sistem deschis, *„în afara echilibrului"*, se realizează prin *„structuri disipative"*, care rezultă din funcționabilitatea ei. Asemenea structuri disipative sînt expresia unui anumit gen de ordine, denumită *ordine prin fluctuații.*

Deci celulele, prin valorile parametrilor lor cinetici și a constantelor de difuzie, prezintă un prag de instabilitate, cu alte cuvinte sînt îndepărtate de starea de echilibru termodinamic. Depărtarea de echilibru a celulelor

[1] **Entropie :** un stadiu al materiei a cărei mărime se exprimă în calorii pe grad și poate fi reprezentată prin gradul dezorganizării sistemului respectiv.

le determină un comportament periodic în timp şi un anumit tip de ordine caracteristică materiei vii. Metabolismul celular implică mai multe mii de reacţii chimice cuplate, de unde şi necesitatea absolută de a fi coordonate. Ori, coordonarea constituie o *ordine funcţională.* Reacţiile metabolice implică enzime, macromolecule cu o anumită structură spaţială dispuse în *structuri submicroscopice* care sînt, la rîndul lor, elaborate de celule. Ordinea macromoleculelor este, în consecinţă, arhitecturală şi funcţională. La nivelul celular şi supracelular, asemenea ordine a macromoleculelor celulare se manifestă printr-o serie de structuri şi funcţii cuplate, de complexităţi crescînde : ţesuturi, organe, sisteme de organe, sisteme de reglaj, deci o ierarhizare integratoare a organismelor vii multicelulare.

Din punct de vedere cibernetic, N. Botnariuc consideră că trebuie făcută deosebire între nivelele de integrare ale materiei vii (celule, ţesuturi, organe, aparate) şi nivelele de organizare ale ei (nivelul individual, populaţional, biocenotic şi al biosferei). Asemenea sisteme biologice au o serie de proprietăţi : caracterul informaţional al activităţilor lor, integralitatea, echilibrul dinamic, programul, autoreglajul şi heterogenitatea lor internă.

Dar celula are în primul rînd un caracter istoric, ca orice sistem biologic. Două miliarde şi jumătate de ani au fost necesari ca să se realizeze primele celule perfecţionate ale eucariotelor. Dealtfel, este bine stabilit că întreaga evoluţie a plantelor şi animalelor începe de la indivizi unicelulari. Istoria constituirii structurii funcţionale celulare a eucariotelor este de fapt „găsirea" soluţiilor optime prin care materia vie se dezvoltă atît în sensul evoluţiei nivelelor de integrare ale organismelor (ţesuturi, organe, sisteme de organe, de reglare a unor funcţii), dar şi în sensul evoluţiei nivelelor de organizare ale lumii vii (indivizi, populaţie — specii, biocenoze, biosferă).

Se consideră că forma de a exista a celulelor este ţesutul la organismele pluricelulare ; la protiste celula indică tocmai primul nivel de organizare al indivizilor. Mergînd în sensul diversificării unor straturi de celule (extern-ectoderm, mijlociu-mezoderm şi intern-endoderm), metazoarele s-au putut diversifica evoluînd pînă la gradul de „cunoaştere" a lumii exterioare şi de „autocunoaştere".

Integralitatea este o trăsătură caracteristică a celulelor, în sensul că un nucleu izolat nu trăieşte, citoplasma anucleată se dezorganizează în scurt timp, distrugerea mitocondriilor dintr-o celulă vie colorată cu verde Janus, prin laser cu rubin, o omoară prin suprimarea respiraţiei etc. Totuşi, trebuie subliniat că oricare celulă a unui ţesut poate fi cultivată „in vitro" ruptă de conexiunile nivelelor superioare de integrare în organism. Recent a fost posibilă cultivarea neuronilor secretători din nucleii diencefalici prin tratarea lor cu virus Sendai. Asemenea neuroni trăiesc şi secretă activ neurohormoni.

Celula este unitatea elementară a materiei vii, capabilă de autonomie. Biologia celulară modernă a dovedit rolul fiecărei structuri celulare. Astfel, nucleul păstrează sistemul de codificare al biosintezelor proteice şi-l transmite de-a lungul generaţiilor celulare prin autoreplicarea ADN cromozomial. Hialoplasma este sediul principalelor căi metabolice şi a producerii mişcării datorită diferenţierilor fibrilare contractile. Mem-

Scanned with OKEN Scanner

brana celulară realizează un aport constant de substanţe nutritive şi tot felul de molecule, ca şi eliminarea „deşeurilor" celulare. Mitocondriile şi cloroplastele sînt convertizori de energie şi producători de substanţe cu un înalt potenţial energetic, care servesc apoi diferitelor travalii celulare (osmotic, chimic, mecanic, electric etc.). Ribozomii, acidul ribonucleic mesager şi cel de transfer realizează biosinteza proteinelor în hialoplasmă, iar reticulul endoplasmatic transportă proteinele „de export" la aparatul lui Golgi unde sînt uneori conjugate cu glucide, sulf etc. şi apoi eliminate în afara celulei.

Toate aceste structuri, cu roluri bine definite în celulă, nu sînt capabile de supravieţuire cînd sînt extrase din celule, cu toate că o serie de componente macromoleculare ale lor pot realiza o serie de activităţi „in vitro". Plasmalema este capabilă de transport activ şi facilitat, membrana internă mitocondrială de fosforilare oxidativă, iar modelele cu ribozomi, *m*-ARN, ATP, GTP, Mg Cl_2, fracţia „*p*H5", un sistem generator de ATP şi aminoacizi, pot sintetiza polipeptide.

Integralitatea este, de fapt, tocmai interacţiunea extrem de complicată dintre structurile şi funcţionarea componentelor celulare. Tocmai datorită acestei integralităţi celulare sînt posibile funcţiile biologice fundamentale : metabolismul, menţinerea stabilităţii unei stări diferenţiate, reproducerea şi adaptarea. Asemenea funcţii nu pot fi reduse la sumarea rolurilor fiziologice ale constituenţilor celulari. De pildă, lanţul transportorilor de electroni din mitocondrii — un proces biochimic de oxido-reducere în cascadă — nu poate fi confundat cu respiraţia celulară compusă dintr-o mulţime de procese interconexate. Însuşirile fenomenelor vitale şi semnificaţia lor provine tocmai din interconexiunile diferitelor reacţii specifice biochimice care se desfăşoară programatic în cadrul fiecărei structuri celulare şi din integrarea acestora în celulă.

Integralitatea se dezvoltă ca rezultat al specializării structural-funcţionale a părţilor componente. Cu cît stadiul diferenţierii este mai înaintat, cu atît interdependenţa dintre structurile celulare va fi mai mare, deoarece şi integralitatea creşte. Dar şi integralitatea dintre ţesuturi, organe etc. în cadrul organismelor creşte atît în cursul dezvoltării ontogenetice, cît şi în filogenie. Amintim numai apariţia sistemelor de reglaj : nervos, neuroendocrin, endocrin, sanguin etc. în cursul evoluţiei animalelor. În cadrul acestor sisteme evoluate, componentele celulare devin foarte dependente de întreg, neuronii nu se mai divid, sînt bine irigaţi de vase sanguine şi asociaţi cu nevroglie. Celula nervoasă nu-şi mai sintetizează ADN dar, în schimb, produce ARN şi proteine necesare reînprospătării continue a membranei prelungirilor nervoase. Omul are 18 miliarde de neuroni în sistemul său nervos şi, dintre aceştia, circa 100 000 mor în fiecare zi dar alţi neuroni nu se mai formează. Sistemul nervos subordonează şi controlează funcţionabilitatea la întreg individul. Dacă ne referim la spongieri, unde nici măcar o reţea nervoasă nu există, atunci putem constata şi gradul mai mare de libertate al celulelor corpului. Un spongier poate fi disociat în celule libere, în apă fără calciu, după care repus în apă normală se reasociază în grămezi celulare care, după un timp, vor reface fiecare cîte un spongier întreg.

Prin creşterea integralităţii se diversifică şi aspectele structurale specifice şi cresc posibilităţile de comunicare din ce în ce mai precise cu exteriorul.

Scanned with OKEN Scanner

Caracterul *informațional* al celulelor constă în aceea că în fiecare moment ele recepționează, acumulează, prelucrează și transmit informații de tot felul. Modelul cibernetic complex, după care funcționează celulele, este reprezentat în primul rînd prin *codul genetic*. Acesta este constituit din patru baze azotate (adenină, guanină, timină și citozină) care permit un număr enorm de combinații ce corespund fiecare la o anumită ordine, care este realizată pentru fiecare specie prin moleculele de ADN cromozomal, reprezentînd „codul" caracterelor ereditare. Informația este tocmai succesiunea perechilor de baze A-T și G-C de-a lungul dublului helix de ADN și se transmite sub formă codificată acidului ribonucleic mesager (*m*-ARN). În celulă sînt cazuri cînd unele gene sînt redundante, cum este cazul celor 800 gene pentru *r*-ARN din dreptul constricției secundare, sau acela al amplificării genelor *r*-ARN din unele oogeneze și care se multiplică de 1 500—3 000 ori. Redundanța [1] este foarte răspîndită în diferențierile celulare și amintim numai cazul unor gasteropode pulmonate, lepidoptere, entomostracei și amfibieni la care M. Varo a descris mozaicuri de ploidii normale și specifice fiecărui tip celular. Ele merg pînă la o multiplicare de 25 ori a complementului cromozomial.

Modul cum va acționa celula la modificările mediului ambinat este legat de organizarea funcțională a ei. Astfel, într-un fel va răspunde o *Amoeba proteus* pusă într-o soluție de albastru alcian și altfel se va comporta un macrofag de mamifer în același colorant, cu toate că amîndouă sînt celule amiboidale. De pildă, volumul protozoarului va crește în 20 min abia cu 0,5% din volumul total, iar volumul macrofagului cu 30% în 60 min. În schimb, amiba pusă într-o soluție de albumină înglobează o mare cantitate din ea, fapt ce determină creșterea volumului corpului de peste 200 ori, corespunzătoare unei creșteri în greutate uscată de 60 ori și a suprafeței celulare de peste 50% din valoarea inițială. Dacă *Amoeba proteus* poate îngloba din mediu numai puțină glucoză, care-i mărește volumul cu abia 2—5%, o altă specie, *Chaos chaos*, înglobează mai multă glucoză, mărindu-și volumul cu 10%.

Toate funcțiile celulare, ca și diferitele etape ale lor, se desfășoară după programe intrinseci care asigură existența și autoreproducerea celulelor. În afară de aceasta toate celulele au incluse programele activităților moleculare a structurilor subcelulare, care sînt programe subordonate sau inferioare. În cazul țesuturilor de la plante și animale o serie de programe superioare asigură existența și autoconservarea individului și determină o anumită activitate celulară. De pildă celulele pulmonare ale fătului uman, în culturi celulare, rămîn în stare diploidă și pot trece printr-un număr de circa 30 reînsămînțări, după care încep să se poliploidizeze și mor.

*

Folosirea izotopilor radioactivi (^{14}C, ^{40}C, ^{87}I, ^{235}U, ^{238}U) a permis calcularea vîrstei scoarței terestre la circa 4,5 miliarde ani. Atmosfera primitivă a apărut acum 3,8 miliarde ani, în urma emanațiilor de gaze provenite din interiorul Pămîntului și care au fost reținute pe suprafața lui, datorită gravității. Pe atunci atmosfera era formată din metan (CH_4),

[1] **Redundanță :** Surplus de informație.

vapori de apă (H_2O), amoniac (NH_3) și bioxid de carbon (CO_2), fiind puternic reducătoare și permeabilă razelor ultraviolete. Foarte probabil că în atmosferă, și mai apoi în apă, să fi luat naștere tot felul de substanțe organice (acizii formic, acetic, succinic, clorhidric, aldehidă formică, riboză, aminoacizi și chiar polipeptide). Sursa energetică a sintezelor biochimice a fost probabil multiplă, provenind nu numai din radiațiile solare ale ultravioletului îndepărtat, dar și din cele ionizante ale razelor cosmice și din descărcările electrice care aveau loc în atmosferă. În orice caz, se admite că geneza materiei vii a fost unică și s-a petrecut într-o anumită fază a evoluției geochimice a Pămîntului, atunci cînd mediul abiotic în întregime avea temperatura sub gradul de fierbere a apei. De aceea, toate viețuitoarele au o singură origine, o aceeași structură celulară fundamentală și aceleași fenomene vitale care le asigură autoconservarea de-a lungul generațiilor. Unitatea se regăsește la nivelul molecular, întrucît de la bacterii pînă la om toate viețuitoarele au în moleculele lor organice cu carbon forma asimetrică, levogiră a acestuia.

Modelele experimentale ale S. Miller au dovedit că în atmosfera primară de hidrogen, metan, amoniac și vapori de apă pot lua naștere, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, aminoacizi și glucide. Chiar prin sărăcirea compoziției în hidrogen și înlocuirea amoniacului cu azot, tot este posibilă sinteza aminoacizilor.

Produsele obținute prin asemenea sinteze pleacă de la un intermediar comun, *cianhidrina*. T. Pavlovskaia și A. Pasînskii presupun că, în urma primelor sinteze atmosferice, s-a acumulat multă aldehidă formică ce s-a solubilizat în apa oceanelor, ca și amoniac care a format cu marea rezervă de clor a apei, clorura de amoniu. Într-adevăr, soluțiile de 1,5% clorură de amoniu și de 2,5% aldehidă formică, la 60°C, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, dau o serie de aminoacizi. Mai mult chiar, la 0°C azotatul de amoniu și aldehida formică formează aminoacizi bazici ca izoleucina. Trebuie subliniat faptul că întîietatea formării aminoacizilor nu s-a datorat hazardului prin care atomii se legau între ei satisfăcîndu-și valențele, ci a fost și este conformă cu structura atomică a lor. Orice grupare de atomi constituie, în realitate, un mic sistem organizat, al cărui cîmp electric este capabil să acționeze asupra mediului înconjurător. Prin urmare, se selecționează alți atomi, pe care-i acceptă și le impun anumite amplasări determinate de proprietățile acestor grupări. Este firesc ca elementele și substanțele atmosferei primitive să nu fi dat naștere la niște compuși întîmplători, ci la molecule active și, în primul rînd la aminoacizi.

Materia capătă o organizare superioară, generatoare de noi structuri. După cum a arătat C. Ponnamperuma și C. Sagan, amestecul primar de aminoacizi obținut de Miller poate fi supus din nou radiațiilor ultraviolete. Dintr-un amestec de aminoacizi, zaharuri și fosfați, care abundau în oceanul primitiv, pot lua naștere nucleotide. Chiar și prin simpla polimerizare a unor aminoacizi pot să se formeze baze azotate cu guanina. Iar cînd adenina, în soluții foarte diluate, se descompune sub influența căldurii în amoniac și acid cianhidric, acestea din urmă formează adenină și guanină, printr-o iradiere în ultraviolet. De altfel, adenina poate lua naștere și dintr-un amestec de amoniac, metan, hidrogen și vapori de apă iradiați cu electroni, avînd o energie de 5 MeV.

Scanned with OKEN Scanner

cît are radioactivitatea naturală a Pămîntului sau a razelor cosmice. Cînd oceanul primitiv a ajuns să aibă baze purinice și pirimidinice, riboză, dezoxiriboză și fosfați, tot sub influența radiațiilor au apărut diferite nucleotide. Așa cum se exprima atît de plastic J. Haldane, «...treptat, „bulionul diluat organic" al apei oceanice din lagune, estuare și regiuni litorale a început să se îmbogățească în substanțe organice. Apare o „supă densă" cu insulițe de materie organică pe suprafața apei». În asemenea condensări, aminoacizii se constituiau în lanțuri scurte de microproteine cu proprietatea de a lega nucleotidele.

Interdependența dintre nucleotide și lanțurile de aminoacizi marchează începutul apariției moleculelor organice. Coacervatele de nucleoproteine, cu proprietatea de autoreproducere, se vor înmulți în proporție cu masa lor, adică geometric. Așa cum susține S. Spiegelman, acizii nucleici se dedublează de la sine, dacă sînt puși într-un mediu propice, mai precis cu un înveliș de proteine în jurul lor și nucleotide libere în mediu (ADN-polimeraza lui Kornberg, care sintetizează ADN, este un singur lanț polipeptidic, cu greutatea medie de 100 000 daltoni, diametrul de 65 Å și cu o singură „sită de ataș" pentru nucleotide). Este foarte probabil ca atunci să fi apărut asemenea tipuri de proteine care dedublau ADN-ul primitiv monocatenar liber. Microproteinele inițale jucau, deci, un rol esențial de comandă a reproducerii nucleotidelor, iar această autoreproducere o antrena de la sine pe aceea a lanțurilor de aminoacizi care le erau asociate. Acordînd, prin calcul, unei nucleotide o șansă la 10 milioane de a „cunoaște", în decursul unei zile, condițiile necesare autoreproducerii sale, ar fi putut ajunge la o masă de cîteva milioane tone ; deci creșterea exponențială a unei mărimi asigură, în timp, valori uriașe. Odată cu o masă din ce în ce mai mare de nucleoproteine, s-a ajuns și la autoreproducerea sa. Mediul, în primul rînd, oferea anumite valori de compoziție chimică, temperatură, presiune, radiații, în limitele cărora avea loc perpetuarea nucleoproteinelor. Asigurarea unei perenități a condițiilor favorabile — lupta împotriva hazardului, adică a nocivității variabilității mediului extern — a fost cîștigată de materie prin formarea celulei. Și cum în luptă intră substanțele din care sînt formate proteinele, în primul rînd învelișul proteic al nucleotidelor, acesta creează nu numai condițiile de autoreproducere într-un ritm rapid, ci o asigură reproducerea în condițiile unei game largi a modificărilor mediului.

Este clar că prin gruparea lor nucleoproteinele vor căpăta forme variate și capacitate de acțiune asupra moleculelor străine. Gruparea nucleotidelor își va exercita puterea de „aservire" asupra proteinelor înconjurătoare.

În cibernetică „a aservi" un sistem înseamnă a-l comanda fără a suferi reacția sa, o asemenea condiție fiind îndeplinită dacă se deține controlul unei energii care îi este aplicată sistemului.

Nucleotidele datoresc fosfaților lor proprii o puternică rezervă energetică, cu ajutorul căreia ele aservesc aminoacizii și îi unesc în proteine. În acest sens, secvența de nucleotide este programul activității proteosintetice. Or, caracterul cibernetic al structurilor biologice celulare va conferi un aspect remarcabil reacțiilor în lanț ale vieții.

Scanned with OKEN Scanner

Viaţa apare astfel ca o reacţie în lanţ moleculară. Ea a început cu dualitatea nucleotide-proteine şi s-a perfecţionat sub forma organismelor eucariote cu dualitatea nucleu-citoplasmă. Chiar de la început nucleotidele „fabricau" deja o gamă de proteine „primitive" care exercitau un număr de activităţi ce asigurau nu numai reproducerea imediată a lanţului de nucleotide, ci şi un mediu special de activitate prin care se controlează această reproducere. Apariţia unui asemenea mediu a însemnat formarea unei citoplasme primitive cu mijloace multiple de protejare a căilor de autoreproducere.

Odată cu apariţia celulelor, a coexistenţei dintre acizii nucleici şi proteinele citoplasmatice delimitate de o membrană externă, viaţa devine esenţa unei evoluţii, deoarece puterea de asimilare a substanţelor nevii conferă un caracter mobil atît arhitectonicii macromoleculare a structurilor celulare, cît şi reglajului metabolismului celular.. Viaţa se va dezvolta, datorită structurii sale celulare, în sensul înmulţirii şi a complexităţii etapelor sale, din moment ce această înmulţire şi complexitate îi măreşte şansele de autopăstrare şi autoreproducere. Ca orice sistem a cărui activitate este întreţinută prin reacţii în lanţ, ca urmare a faptului că în asemenea cazuri procesele se perpetuează fără intervenţii din afară, „schema de organizare" este vie. De aceea, începînd cu organizarea celulară a materiei vorbim de materia vie.

Celulele, ca structură a materiei vii, stau la baza organizării protiştelor, plantelor şi animalelor. Ele sînt la rîndul lor formate din structuri subcelulare (nucleu, mitocondrii, ergastoplasmă, ribozomi, dictiozomi, centrioli etc.) care îndeplinesc funcţii anumite. Viaţa celulei este rezultanta activităţilor structurilor subcelulare considerate în interdependenţă şi concurînd spre autoconservarea şi reproducerea sistemului celular.

Celulele au o proprietate fundamentală, şi anume, aceea de a *structura-liza*, care decurge din funcţia de asimilare a materiei vii, nefiind un simplu fenomen chimic, deoarece se reflectă printr-o construcţie arhitectonică macromoleculară, care se consumă prin dezasimilaţie, producîndu-se neîncetat compuşi bogaţi în energie (ATP, GTP etc.) necesari diferitelor activităţi celulare. Deosebirile morfologice la nivelul speciilor — această complexitate şi multitudine de forme animale şi vegetale — nu decurge atît din varietatea tipurilor celulare care constituie ţesuturile şi organele, ci din combinarea diferitelor tipuri de ţesuturi într-o serie de organe şi sisteme de forme foarte felurite. Ca să ne referim la o clasificare mai veche a tipurilor de celule, distingem la animale celule de acoperire, nutritive, glandulare, urticante, senzoriale, nervoase, gliale, excretoare, musculare, conjunctive şi germinative. După cum se poate vedea, aceste relativ puţine tipuri de celule sînt materiale de construcţie pentru genurile şi speciile din cele circa 31 încrengături ale regnului animal, apărute în decursul ultimilor 600 milioane de ani din viaţa planetei noastre.

Aşa cum s-a mai arătat, materia vie, sub forma ei celulară, îşi are originea în forme precelulare — asamblări de nucleotide ca „micropicături", acizi nucleici-proteine — cu o activitate structurantă, care s-a manifestat în sensul asigurării autoreproducerii şi conservării sale. Or, asemenea activităţi structurante au apărut de la primele „micropicături" şi abia după aceea au urmat etapele succesive ale heterotrofelor cu funcţii fer-

Scanned with OKEN Scanner

mentative, care dobîndesc apoi facultatea de reproducere, după care apar procesele de fotosinteză și, în final, respirația, separîndu-se ulterior autotrofele de heterotrofe.

Asemenea structuri au prezentat transformări care s-au desfășurat în timp, cu un joc de anticipații și de retroacțiuni, ritmuri și fenomene reversibile pe care le-au păstrat în decursul generațiilor. Maximum dezvoltării celulare a fost atins de eucariotele care se divid mitotic. Ipotezele moderne privind originea acestor feluri de celule, dealtfel a marii lor majorități, sînt destul de îndrăznețe și merită să fie analizate :

Mitoza. Acest tip de reproducere a celulelor asigură distribuția egală a cantității de acizi nucleici la fiecare diviziune celulară și a apărut, sub formele ei primitive, odată cu celulele, acum circa 3 miliarde de ani. Este foarte probabil că ea s-a produs după apariția atmosferei oxidante, deoarece toate organismele eucariote mitotice sînt fundamental aerobe. Dată fiind abundența eucariotelor animale și plante fosile, mitoza se apreciază că s-ar fi desăvîrșit la sfîrșitul cambrianului, adică acum aproape 6000 milioane de ani.

M. Margulis a conceput o teorie a discontinuității între celulele eucariotelor mitotice și celulele procariotelor amitotice. La celulele eucariotelor s-a ajuns pornind de la procariote printr-o serie de anumiți „endosimbionți". Astfel, pentru a înțelege evoluția mitozei trebuie urmărită evoluția celulelor procariote în atmosfera reducătoare, trecerea la atmosfera oxidantă și evoluția unor „simbionți" vechi, ca : mitocondriile, chinetozomii flagelilor și cloroplastele, considerate ca derivînd din celule libere. Celulele procariote s-au dezvoltat în condițiile unei atmosfere reducătoare terestre primitive acum $4,5—2,7 \times 10^9$ ani. Ele conțineau ADN, sintetizau proteine și ribozomi și foloseau ARN mesager ca intermediar între ADN și proteine — caracteristici fundamentale ale vieții celulare de la apariție ca și pînă acum.

De timpuriu, în istoria procariotelor a apărut secvența unor nucleotide care codificau sinteza porfirinelor. Fotodisocierea vaporilor de apă din atmosferă a dus la eliberarea hidrogenului și oxigenului molecular, ceea ce a determinat o reducere puternică a acizilor nucleici din sistemele celulare autoreproducătoare, dacă nu erau protejate de porfirine. Genele care codificau sinteza unor astfel de porfirine chelate (coenzimele peroxidazelor și catalazele) au devenit dominante în cadrul selecției naturale, continuîndu-se de-a lungul mileniilor producerea unor agenți oxidanți pe cale naturală. Faptul incidental că astfel de compuși antimutageni absorb preferențial lumina vizibilă s-a înscris în folosul evoluției materiei vii. În felul acesta, celulele fotosintetizante, care conțineau mecanisme de sinteză a ATP-ului (și a altor nucleotide), utilizînd energia solară, au înlocuit pe cele în care ATP era sintetizat prin absorbția directă a ultravioletelor. Cu energia eliberată din fotoproducerea ATP-ului, atomii de H din hidrogenul atmosferic și din H_2S au fost folosiți în reducerea CO_2 din structurile celulare.

În alte populații de bacterii heterotrofice, la care producerea ATP-ului era dependentă de fermentația zaharurilor și a aminoacizilor, au fost reținute de selecție acele celule care foloseau porfirinele lor pentru a oxida eficient hidrații de carbon. Aceasta a condus la microorganisme

Scanned with OKEN Scanner

capabile de producere a ATP prin medierea citocromilor ca sisteme de transport al electronilor (exemplu : respirația anaerobă la bacteriile reducătoare de N și S).

Prin fototrofele primitive s-a dezvoltat o populație de celule care folosea ATP fotoprodus și apa ca sursă de atomi de H pentru reducerea CO_2 în anabolismul celular. *Aceasta a dus la formarea oxigenului gazos ca un produs al fotosintezei.* Eliminarea de O_2 de către microorganismele fotosintetizante a produs o creștere a presiunii parțiale a O_2 în atmosferă. Abundența, cel puțin în unele locuri, a oxigenului a determinat efectuarea ultimului pas spre respirația aerobă : oxidarea completă a hidraților de carbon prin sistemul citocromilor cu eliberarea de CO_2 și H_2O.

Dintre microorganismele autotrofe care foloseau porfirinele în fotosinteza anaerobă în lumină vizibilă, s-au selectat mutantele care puteau utiliza cîteva porfirine pentru respirația aerobă în absența luminii, ceea ce a condus la evoluția algelor procariote ancestrale spre algele albastre—verzi actuale, cu ambele mecanisme pentru producerea ATP : fotosintetic și respirator. Aceste procariote multilaterale au reprezentat un mare pas înainte în creșterea eficienței metabolismului celular. Ele au continuat să elimine O_2 gazos în fotosinteză și au accelerat trecerea spre atmosfera oxidantă. Astfel, la cîtva timp după formarea Pămîntului și înainte de depozitarea rocilor oxidate și microfosilelor (o perioadă de aproape 2400 milioane ani), au evoluat populațiile de procariote cu posibilități fotosintetice și respiratoare.

Mărirea continuă a cantității de O_2, ca produs al fotosintezei, a dus la un impas : toate celulele tindeau spre adaptarea la o nouă atmosferă cu O_2, dar ele nu puteau supraviețui decît într-o ambianță specializată anaerobă. Dovezile geologice arată că O_2 a fost prezent în atmosferă cel mai devreme acum $2{,}7 \times 10^9$ ani și a început să devină relativ abundent acum circa $1{,}2 \times 10^9$ ani. În acest timp toată producția de materie organică abiogenă, care era principala sursă de energie, a fost stagnată pe de o parte datorită absorbției razelor ultraviolete de către ozon în atmosfera superioară, iar pe de altă parte, dacă ea s-ar fi produs, ar fi fost rapid oxidată. *Deci, toată viața terestră începe să fie dependentă direct sau indirect de fotosinteza celulară încă de acum* $1{,}2 \times 10^9$ *ani.*

Pentru a-și asigura replicarea acizilor nucleici, heterotrofele au fost nevoite să se hrănească cu materie organică produsă de fotosintetizante sau de chemoautrotrofe. Aceasta sugerează că primul pas în originea eucariotelor, pornind de la procariote, a fost legat de supraviețuirea într-o atmosferă nouă cu O_2. Microorganismele procariote aerobe au fost ingerate în citoplasma heterotrofelor anaerobe, rezultînd astfel primele organisme amiboidale amitotice aerobe.

Prima achiziție simbiotică — a protomitocondriei — a dus la celule avînd căi de oxidare a hidraților de carbon tipice de eucariote : degradarea anaerobă a glucozei în piruvat prin calea Embden Meyerhof și producerea lui în citoplasma solubilă sub controlul genomului gazdei. Mai departe, oxidarea glucozei cu ajutorul O_2 molecular în ciclul Krebs este produsă numai în mitocondria simbiotică, sub controlul propriilor ei gene. Din această simbioză mitocondrie-gazdă, s-ar putea să fi rezultat membranele fosfolipidice tipice de la eucariote — cenapsele steroidice — și în special formarea unei membrane nucleare și a reticulului endoplasmatic

Scanned with OKEN Scanner

neted. Unele amibe au încorporat cu siguranță procariote mobile care au devenit astfel simbiotice și au format amiboflagelatele primitive. *În cadrul acestor amiboflagelate primitive heterotrofe a evoluat mitoza clasică.* Genele endosimbiontului mobil codificau caracteristicile lui morfologice, adică prezența în secțiune transversală a 9 fibrile dispuse după generatricea unui cilindru, plus 2 fibrile centrale (9 + 2). Celula amiboidă a gazdei, care a reținut endosimbiontul mobil, avea un avantaj selectiv imens, acela al mobilității, mult înainte de a se fi produs mitoza. Ea poate acum urmări activ hrana. Deci *endosimbiontul procariotic mobil este considerat strămoșul complexului flagelar al celulelor eucariote.*

Replicarea acizilor nucleici ai genelor endosimbiontului, care determină caracteristica lui de structură (9 + 2), a fost eventual folosită de către celulă pentru a forma centromerii cromozomiali și centriolii eumitozelor și pentru a distribui cromatina nou sintetizată a gazdei în celulele-fiice ale gazdei. Pentru diferențierea acizilor nucleici ai endosimbiontului în centromerele cromozomiale și corpii bazali, au fost necesare cel puțin două mutații și anume : una conducînd la dezvoltarea unei atracții între acizii nucleici ai gazdei și aceia ai simbiontului și eventual la conexiuni permanente (ale endosimbionților-fii cu cromozomii-fii ai gazdei în formarea centromerelor cromozomale), iar a doua conducînd la segregarea endosimbionților replicați la doi poli opuși ai celulei-gazdă. În orice caz, din fiecare generație selecția „a reținut" celulele care posedau mecanisme îmbunătățite ale segregării acizilor nucleici ai celulelor-gazdă.

Judecînd după figurile mitotice actuale la eucariotele inferioare, se crede că evoluția mitozei s-a produs pe căi diferite în diferitele amoeboflagelate primitive, astfel că unele mitoze la eucariotele inferioare sînt analoage mai curînd decît omoloage. În primul grup, acela al flagelatelor eucariote primitive, acizii nucleici ai simbiontului sînt folosiți numai pentru replicarea lor și pentru sinteza proteinelor proprii. Avantajul imediat al selecției achiziționării endosimbiontului (9 + 2) a fost mobilitatea. Urmașii acestui fenomen persistă în unele grupuri izolate ale flagelatelor mici ca, de exemplu, la *Tetramitus.*

Mutațiile produse în populațiile acestor organisme au și dus la dezvoltarea unei atracții între acidul nucleic al gazdei și al endosimbiontului (9 + 2), atracție din care a rezultat încorporarea genomului replicativ al endosimbiontului (9 + 2), în nucleul gazdei.

Cînd endosimbiontul (9 + 2) s-a diviziat, el a fost folosit în celulă ca centru de diviziune intranuclear. Probabil, de la acest grup de organisme s-au dezvoltat unele grupe mitotice actuale : zigomicetele, ascomicetele și bazidiomicetele, algele verzi care se conjugă, algele roșii precum și schizogoniaceele. La toate aceste organisme lipsește flagelul în toate stadiile ciclului lor vital, chiar dacă multe dintre ele sînt active. Cum a început mitoza în această linie la care flagelul lipsește în mod permanent ? Primul pas l-a făcut replicarea omologului (9 + 2) după ce el a devenit centru de diviziune intranucleară în absența diviziunii nucleare, ceea ce a dus la apariția unei perechi a omologului (9 + 2) intranuclear.

Termenul de „omolog (9 + 2)" este folosit în cel mai general sens : el implică sistemul genetic care codifică dezvoltarea flagelului, a cililor, centrilor de diviziune, centriolilor sau oricare altul din aceste organite omoloage.

Scanned with OKEN Scanner

Unele mutații produse au făcut ca un membru al perechii să fie atras de cromatina gazdei și, eventual, să funcționeze ca centromer cromozomal ; celălalt, neatras de cromatina gazdei, a funcționat ca un centriol intranuclear. Membrii acestei perechi însă se atrag unul pe altul. Atracția omologului (9 + 2) — centromer cromozomal — duce cu sine cromatina gazdei care este mișcată astfel spre omologul (9 + 2) — centriol intranuclear.

O altă cale de evoluție au avut-o celulele care erau mobile în anumite stadii ale ciclului lor vital. În stadiile nemobile, corpusculul bazal al flagelului (9 + 2) intră în nucleu și se divide, fiind „împrumutat" în noua celulă ca centriol pentru segregarea cromatinei sale. După diviziune omologul (9 + 2) își rezumă funcția la aceea de corp bazal. Această linie a condus la apariția amiboflagelatelor care nu se divid în timpul stadiilor mobile, iar la unele se poate vedea chiar o relație morfologică între flagel și nucleu. Urmașii acestei linii sînt : *Naegleria,* dinoflagelatele, *Dimastigamoeba, Mastigella* și *Mastigina.* Primele 2 grupuri sînt considerate ca fiind premitotice, prin aceea că fenomenul sexual nu este cunoscut, sau apariția lui este discutabilă.

Mutațiile produse în continuare au făcut ca pe de o parte omologii (9 + 2) rezultați din diviziune să servească în mod permanent ca centri de diviziune intranucleari, iar pe de altă parte să fie reținuți doar sub formă de corpi bazali independenți de flagel. Seria unor astfel de mutații a condus la apariția protozoarelor, algelor verzi, algelor brune etc. Una, sau poate mai multe din aceste linii, se crede că a condus la apariția plantelor verzi eumitotice cu stadii flagelate mobile și centri de diviziune intranucleari, iar altele poate au dus la evoluția sporozoarelor.

Avantajul acestor mutații este clar : ele asigură organismului distribuția egală a cromatinei dar mențin și mobilitatea flagelului. Grupele relativ omogene ale protozoarelor, cum sînt ciliatele cu nucleii lor dimorfici, probabil au evoluat de la serii omoloage de mutații ale liniei amiboflagelatelor primitive. Ele au un micronucleau eumitotic (cu un fus intranuclear) asigurînd continuitatea genetică și mențin corpii bazali care se replică la baza cililor, independent de aparatul mitotic. Deci „linia germinală mitotică" și „soma premitotică" sînt diferențiate în două tipuri de nuclei (micro- și macronucleu) în aceste organisme. Macronucleul endoploid nu conține centromeri cromozomiali sau cromozomi individuali și se divide amitotic. Probabil, seriile mutațiilor care au fost selectate pentru eumitoză în micronucleu au început într-o celulă binucleată, în care au fost produse în mod regulat multe copii ale genomului rezervate pentru codificarea activă a sintezelor proteice. Evoluția eumitozei nu s-a produs niciodată în macronucleu.

În membrii populațiilor primordiale de amiboflagelate conținînd omologul (9 + 2) intranuclear, mutațiile trebuie să fi dus la celule în care corpii bazali ai flagelului, cînd se divizau, funcționau ca centri de diviziune extranucleari. Exemple în care corpul bazal funcționează ca centru de diviziune extranuclear în timpul stadiilor mitotice se întîlnesc la forme foarte diferite ale multor organisme existente : *Dimorpha mutans, Clathrina, Ochromonas, Centropyzis.* Unele din aceste organisme *(Acanthocystis, Wagnerella)* au figuri de diviziune de tip animal dar centriolii nu

Scanned with OKEN Scanner

se disting de corpul bazal flagelar. În timpul diviziunii flagelul multor asemenea organisme este încă ataşat de centriolii polilor fusului mitotic.

În unele cazuri, cînd omologul (9 + 2) se divide, un produs al diviziunii funcţionează ca centriol, iar celălalt dă naştere la corpul bazal flagelar care se diferenţiază şi nu mai este capabil să continue replicarea. Această linie de evoluţie în care corpii bazali extranucleari funcţionează ca centrioli care atrag centromerii cromozomiali se poate observa la unele flagelate specializate care menţin tot timpul ciclului lor vital conexiuni morfologice între aparatul flagelar şi figurile mitotice (exemplu : *Trichomonas, Polymastix, Heteromita, Prowazekia, Eudorina).* În unele organisme această conexiune a fost pierdută secundar (exemple : *Cryptobia, Herperomonas, Vaucheria, Dictyota, Paramoeba).* Protozoarele hypermastigine sînt în special ilustrative pentru acest grup. Aceste mutaţii care au condus la centrioli tipici şi amfiasteri ai mitozelor de tip animal au produs împărţirea omologilor (9 + 2) în două grupuri : în primul grup omologul (9 + 2) dă naştere permanent la corpi bazali care produc flageli, iar în celălalt grup omologul (9 + 2) dă naştere la centrioli extranucleari tipici prin pierderea celor două fibre centrale ale omologului (9 + 2).

Avantajul unei diferenţieri funcţionale permanente a celor două organite este clar : mobilitatea flagelară este complet independentă de aparatul mitotic. Exemple de acest tip de mitoză cu amfiasteri înconjurînd centriolii extranucleari se întîlnesc la unele protozoare şi, mai ales, în grupul metazoarelor.

Argumentul prezentat de Margulis în favoarea originii celulelor eucariote este achiziţia prin simbioză a mitocondriilor, plastidelor şi a genomului complexului flagelar (9 + 2). Într-adevăr, aceste trei organite îndeplinesc condiţiile generale ale organitelor dobîndite prin simbioză, şi anume : au ADN propriu pe care şi-l pot replica prin mecanisme proprii de sinteză ; ARN mesager complementar ADN-ului ; un sistem de sinteză de proteine elaborate şi de structură.

Dacă această teorie este corectă, toate celulele eucariote ar trebui văzute ca sisteme multigenomice iar scopul chimiei celulare este înţelegerea căilor prin care toate reacţiile biochimice sînt codificate de acizii nucleici ai nucleului şi ai organitelor subcelulare. Toate eucariotele trebuie să conţină cel puţin trei tipuri specifice de ADN : nuclear, mitocondrial şi al omologului (9 + 2), sau un ADN asociat cu cloroplastele la plantele eucariote. Bazele eredităţii citoplasmatice sînt probabil legate de mitocondrii, plastide, omologul (9 + 2) sau alte organite citoplasmatice mai puţin răspîndite (particulele „kappa" de la *Paramaecium aurelia).*

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

PLASMALEMA

Membrana vie poate fi definită după metodele prin care se studiază. Prin microscopia fotonică se evidenţiază o limită aproape imperceptibilă ce separă două compartimente celulare cu refringenţe sau colorabilităţi diferite. La microscopul electronic se evidenţiază o limită sau mai multe, opace, ce reprezintă frontierele celulelor. Analizele biochimice identifică plasmalema cu un film molecular lipoproteic, iar din punct de vedere biofizic, membrana celulară se manifestă prin sarcinile electrice ale ansamblurilor moleculare în faze polare sau apolare.

Funcţional, ea constituie o barieră cu roluri multiple : permeabilitate selectivă, transport activ, plasticitate, extrusii şi coalescenţă, transformarea energiei, transport al influxului nervos etc. Multitudinea cercetărilor întreprinse în ultimul deceniu asupra membranelor vii constituie obiectul unui nou domeniu de studiu denumit *membranologie*.

O definiţie cuprinzătoare a membranei vii a fost dată de F. Siekevitz şi G. Palade, după care *«membrana biologică este un complex molecular care mărgineşte „frontiera“ unui anumit teritoriu celular»*. Această „frontieră“ vie funcţionează pe plan structural ca separator al diferitelor compartimente celulare (nucleu, reticul endoplasmic, cisterne şi vacuole golgiene, mitocondrii) din interiorul celulei sau ca izolant (plasmalema) de mediul extracelular. Asemenea separări sînt variabile, suple, modificîndu-se în timp, influenţate atît de caracteristicile mediului, cît şi de activitatea metabolică celulară.

Membrana este un loc de trecere al fluxului molecular, dar şi o barieră care se opune scurgerii lui. Lipidele şi proteinele acestei frontiere se unesc prin legături necovalente şi sînt astfel aranjate că zonele hidrofobe sînt orientate spre interior, iar cele hidrofile spre exterior. Membranele se pot izola de celule ca subfracţie, care îşi păstrează şi „in vitro“ structura şi funcţiile“.

1.1. STRUCTURĂ ŞI ULTRASTRUCTURĂ

S-au propus două modele de structură ale membranelor vii : unul *lamelar* şi altul *miceliar*, pe care le vom analiza în cele ce urmează.

1.1.1. MODELE DE STRUCTURĂ LAMELARĂ

Asemenea modele au fost propuse încă din 1925 de către E. Gortner şi R. Grendel, bazaţi pe tehnica lui Langmuir. Ei au extras lipidele eritrocitare dintr-o probă de sînge, cu un număr cunoscut de celule şi le-au turnat, solvite în benzen, pe interfaţa apă-aer a unui vas umplut parţial cu apă (fig. 1). După evaporarea benzenului, moleculele lipidelor polare rămîn împrăştiate pe suprafaţa apei. Apoi, cu un fir de aţă ţinut de ambele capete, au strîns stratul de lipide începînd de

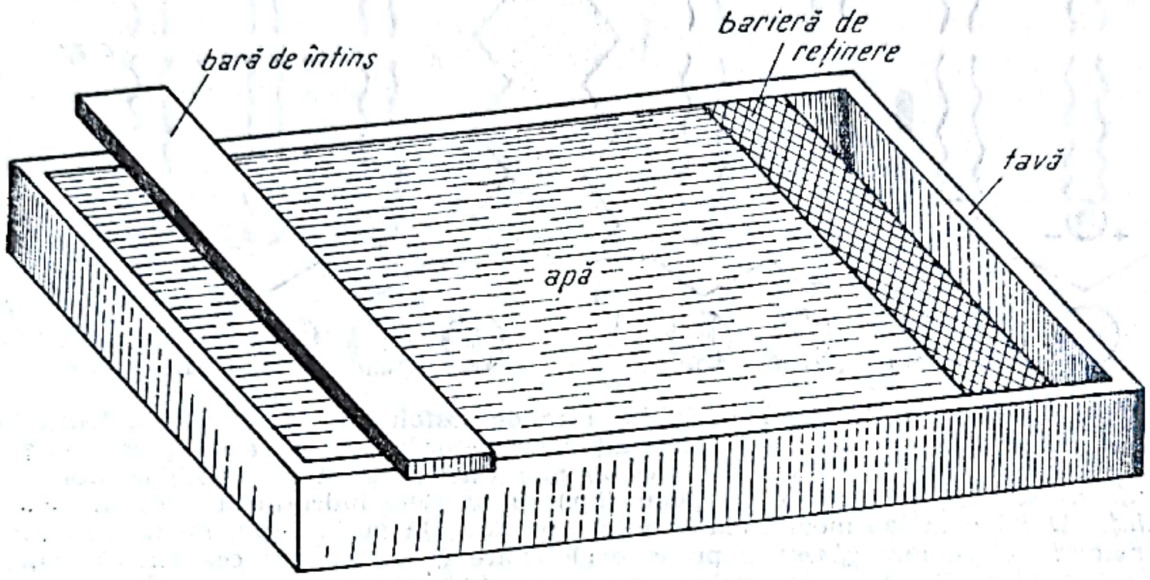


Fig. 1. Diagrama jgheabului lui Langmuir.

la un capăt spre bariera de reţinere, pînă cînd stratul a început să opună rezistenţă la o compresiune suplimentară. La această limită, lipidele polare formează un strat monomolecular continuu şi compact, cu grupările polare în apă şi lanţurile hidrocarbonice în aer. Cunoscîndu-se suprafaţa unui eritrocit şi numărul lor din proba măsurată, s-a putut calcula suprafaţa totală a eritrocitelor din probă, care este pe jumătate faţă de suprafaţa monostratului împrăştiat pe apă şi compact.

Deci membrana vie este constituită dintr-un *strat lipidic bimolecular*. S-a observat însă că tensiunea superficială a amibelor este de 0,2 dyne/cm^{-1}, în timp ce a interfeţei lipide-apă este de 36 dyne/cm^{-1}, indicînd un *conţinut proteic* al membranelor care le scade tensiunea superficială.

Pe acest considerent J. Danielli şi R. Dawson (1936) au propus cunoscuta *ipoteză a membranei lipoproteice*, după care membranele celulare sînt formate din două filme suprapuse de molecule lungi fosfolipidice, aşezate paralel unele cu altele ; pe feţele lor libere se află proteine fibrilare (fig. 2). Fiecare moleculă fosfolipidică are grupări hidrofobe (apolare). Grupările apolare ale unui strat se leagă cu grupările celuilalt prin legături van der Waals, care se stabilesc între resturile metilate ale lanţurilor lungi, dezordonate, de acizi graşi. Capetele polare ale fosfolipidelor încărcate + sau — sînt neutralizate de funcţiile secundare ionizate — sau + ale resturilor de aminoacizi din proteinele fibrilare.

Scanned with OKEN Scanner

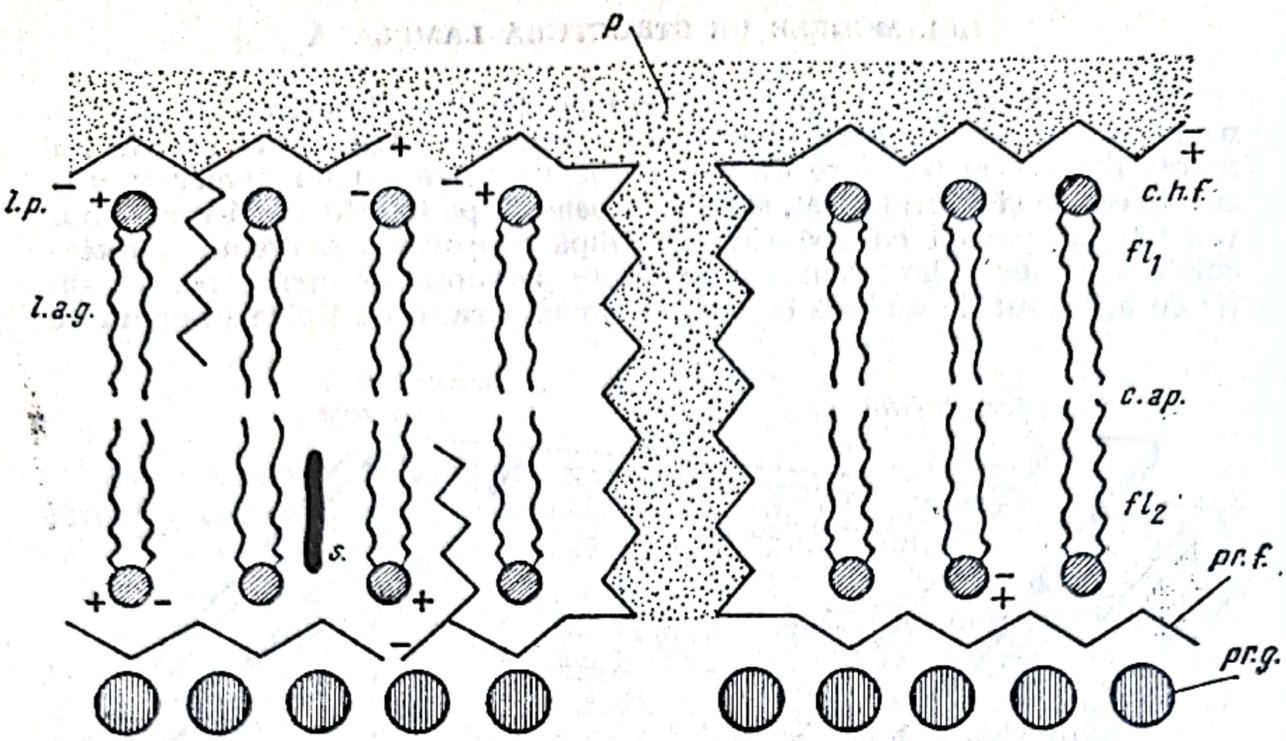


Fig. 2. Modelul lui Danielli. Dublul film de fosfolipide (fl_1 şi fl_2) se leagă la mijloc prin capetele hidrofobe ale lanţurilor dezordonate de acizi graşi (*l.a.g.*). Pe ambele feţe acest dublu film fosfolipidic este acoperit de proteine fibrilare (*pr.f.*) unite prin legături de tip polar (*l.p.*) cu capetele hidrofile ale fosfolipidelor (*c.h.f.*). Din loc în loc membrana se întrerupe datorită porilor (*p.*). Pe faţa internă a membranei se mai găsesc şi proteine globulare (*pr.g.*), iar pe cea externă polizaharide ; *c.ap.* — capete apolare.

În felul acesta se explică permeabilitatea relativă a membranei pentru substanţele liposolubile.

Pentru a explica difuziunea rapidă a apei şi glucidelor prin astfel de model, Danielli admite şi existenţa porilor. Deci, acest model lamelar este format din 3 foiţe ; una centrală, cu două filme fosfolipidice, acoperită pe ambele feţe de cîte o foiţă de proteine fibrilare.

Membrana plasmatică este totuşi asimetrică, deoarece faţa se externă se acoperă de macromolecule polizaharidice, iar cea internă de proteine globulare. Booiş şi H. Bungenberg de Jong cred că legătura dintre proteine şi capetele polare ale lipidelor se realizează prin punţi complexante. Astfel, sterolii, dintre fosfolipide, sînt legaţi de proteinele fibrilare prin intermediul Mg^{++} şi K^{+} (fig. 3). O. Hechter (1965) concepe straturile proteice ca fiind organizate pe cele două feţe ale dublului film fosfolipidic într-o reţea pseudocristalină de discuri proteice în apă de imbibiţie, cu cationi şi anioni (fig. 4).

Măsurarea capacităţii electrice a membranelor vii la frecvenţe înalte este pentru toate tipurile de celule în jurul a 1 microfarad/cm^2. Aceasta corespunde unui strat de lipide cu o constantă dielectrică 3, o grosime de 30 Å şi o conductibilitate ionică scăzută, în comparaţie cu citoplasma sau plasma interstiţială. Aceste valori pot corespunde şi unui amestec de fosfolipide-proteine, la care constanta dielectrică este de $3x$, iar grosimea stratului tot de $3x$.

Scanned with OKEN Scanner

Studierea la microscopul electronic a celulelor fixate în 1% OsO_4 în tampon fosfat 0,15M, la *p*H = 7,4 dezvăluie la membrană o structură trilamelară, pe baza căreia se fundamentează în prezent concepţia lui Danielli. Os, ca şi Mn din fixator, realizează legături electrostatice între sarcinile purtate de proteine, părţile polare ale fosfolipidelor şi dublele legături ale lanţurilor hidrocarbonice constante. În felul acesta, membrana secţionată perpendicular apare *trilamelară:* o bandă clară la mijloc, de 40 Å, avînd de o parte şi de alta cîte un strat opac electronilor, gros de 20—30 Å. Aceeaşi structură trilamelară, groasă de 75 Å ca şi a membranei vii, a fost descrisă şi pe secţiuni ultrafine făcute în membrane artificiale de fosfolipide şi globulină, ajungîndu-se la concluzia că grupările polare, în special, formează un număr mai mare de suporturi de fixare a Os decît lanţurile hidrocarburilor. În cursul fixării, lanţurile hidrocarbonice se

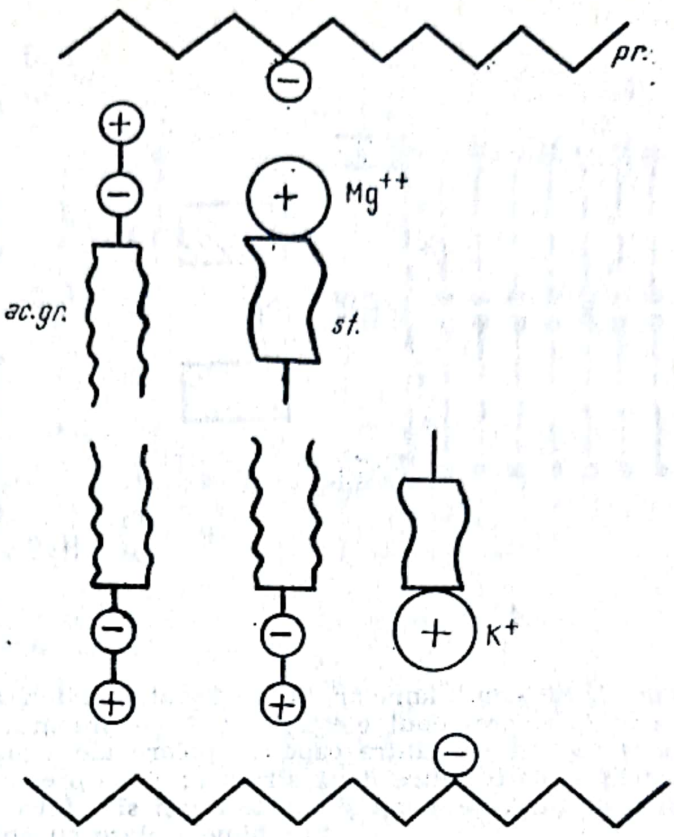


Fig. 3. Modelul lui Booi s:
ac.gr. — acizi graşi ; *st.* — steroli ; *pr.* — proteine ; Mg++, K+ cationi minerali ce leagă proteinele de lipide prin punţi complementare.

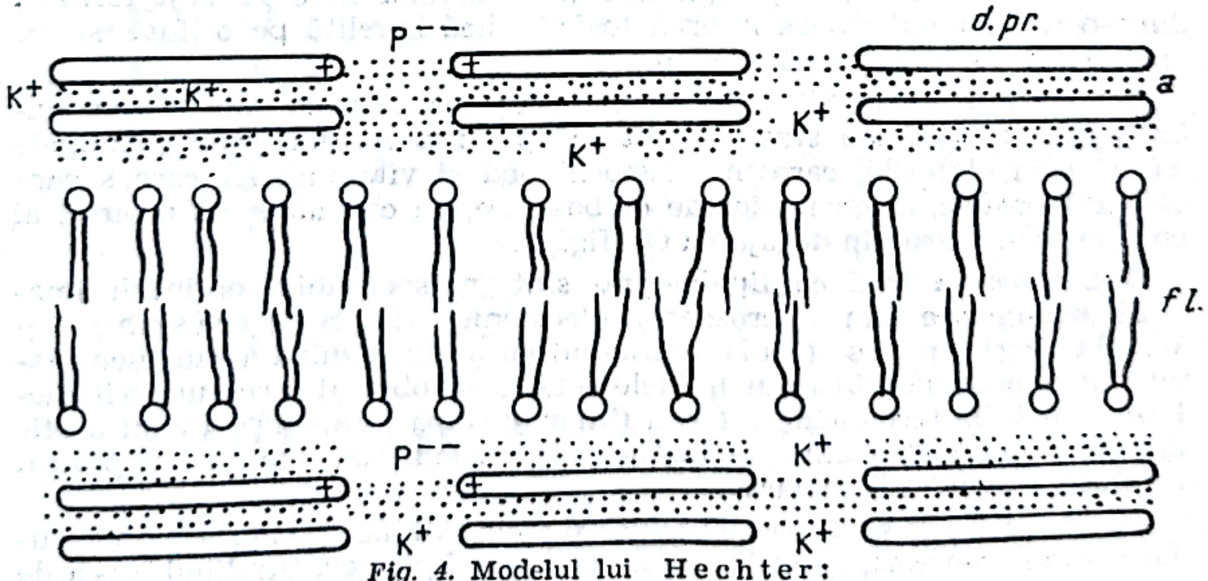


Fig. 4. Modelul lui Hechter:
d.pr. — discurile de proteine organizate în reţea tridimensională cu apă de imbibiţie (*a*) între ele şi legate cu capetele polare prin intermediul ionilor de P−− şi K+ ; *fl.* — fosfolipide.

Scanned with OKEN Scanner

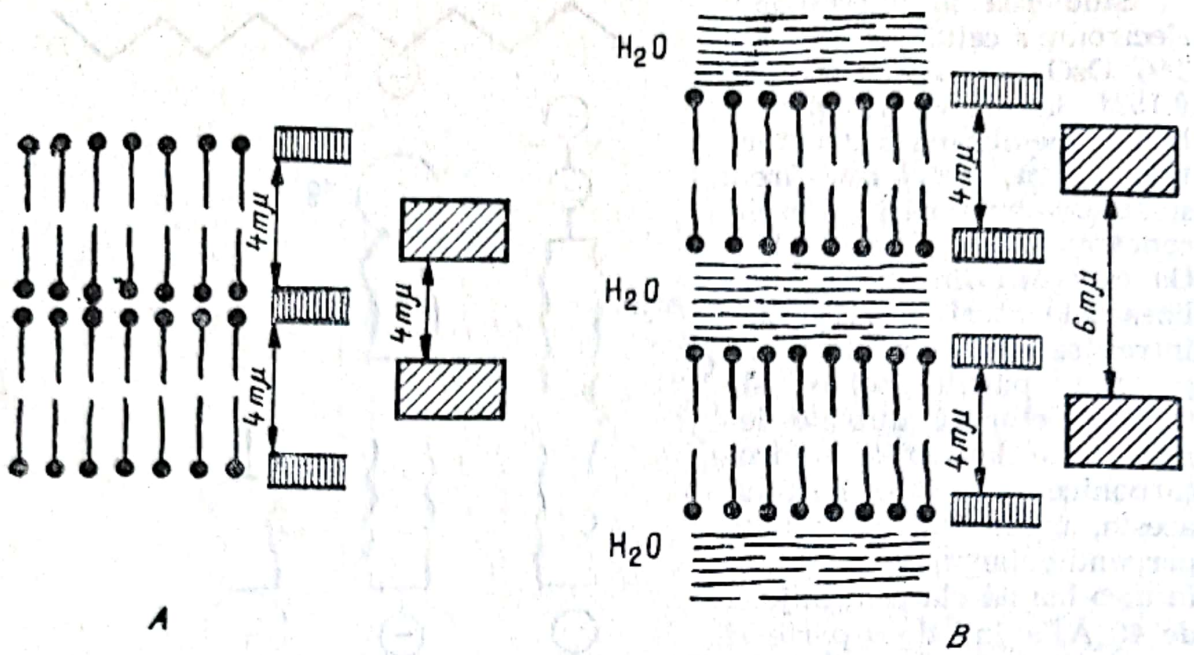


Fig. 5. Sistemul lamelar la *L*α-fosfatidilcolină obținut prin fixare cu OsO_4 și văzut la microscopul electronic: *A* — preparat nehidratat cu benzile la distanțe de 4 mμ cît sînt între capetele polare ale stratului bimolecular, dar și între capetele apolare dintre două straturi; *B* — preparat hidratat cu benzile întotdeauna la o distanță de 4 mμ și nu de 6 cîți sînt între capetele apolare dintre două straturi bimoleculare cu apă între ele.

reorientează în sensul îndreptării grupărilor nesaturate la suprafața lamelelor (fig. 5); Os formează interconexiuni între ele precum și între grupările polare la nivelul interfeței cu mediul apos.

Asemenea date au permis lui J. Robertson să fundamenteze *teoria membranei unitare,* după care toate membranele vii sînt formate dintr-o foiță bimoleculară internă fosfolipidică învelită pe o față și pe alta de cîte un strat proteic (fig. 6).

Un grad de complexitate foarte mare îl prezintă membranele tilakoizilor (cloroplaste) unde stratul mijlociu este reprezentat prin glicolipide dar și prin clorofilă, caroten, plastochinonă și vitamină K_1 care separă un strat proteic, al enzimelor de carboxilare, de celălalt strat proteic, al enzimelor implicate în degajarea O_2 (fig. 7).

S-a observat însă că lipidele nu sînt indispensabile obținerii imaginii trilamelare din microscopia electronică. B. S. Fleischer și W. Stoeckenius (1967), extrăgînd cu acetonă diluată din membranele mitocondriale 95% din lipidele totale, au obținut structuri trilamelare ca și la mitocondriile intacte. Chiar și după extracția cu acid acetic diluat a proteinelor din membranele mitocondriale, ele și-au păstrat aceeași structură trilamelară.

L. Napolitano (1967) aduce o probă decisivă asupra materialului care se colorează cu OsO_4, după extracția lipidelor. Studiind teaca de mielină (care este un teanc de plasmaleme ale celulei Schwann înfășurate în jurul axoplasmei), găsește că după extracția lipidelor imaginea trilamelară este dată de proteine. Fibra nervoasă este mai întîi fixată 48 ore

Scanned with OKEN Scanner

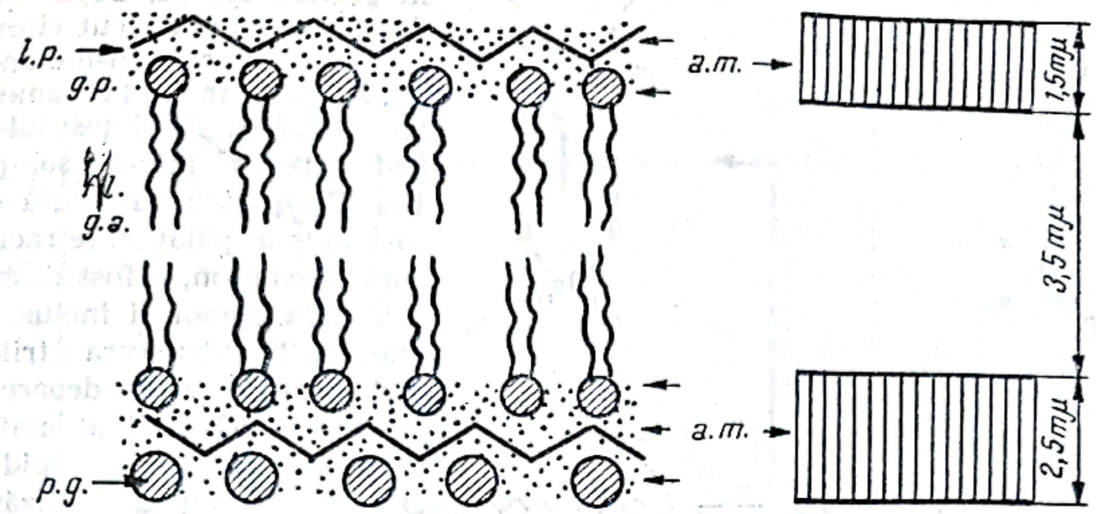


Fig. 6. Structura moleculară a membranei și aspectul electronmicroscopic obținut prin colorație pozitivă :

l.p. — lanț proteic ; *fl.* — fosfolipide ; *g.p.* — grupări polare ; *g.a.* — grupări apolare ; *p.g.* — proteine globulare ; *a.m.* — atomi metalici (Os, Mn) care reacționează cu grupările polare, proteinele fibrilare și globulare, dînd două benzi opace fasciculului de electroni, groase în medie de 2,5 mμ fiecare.

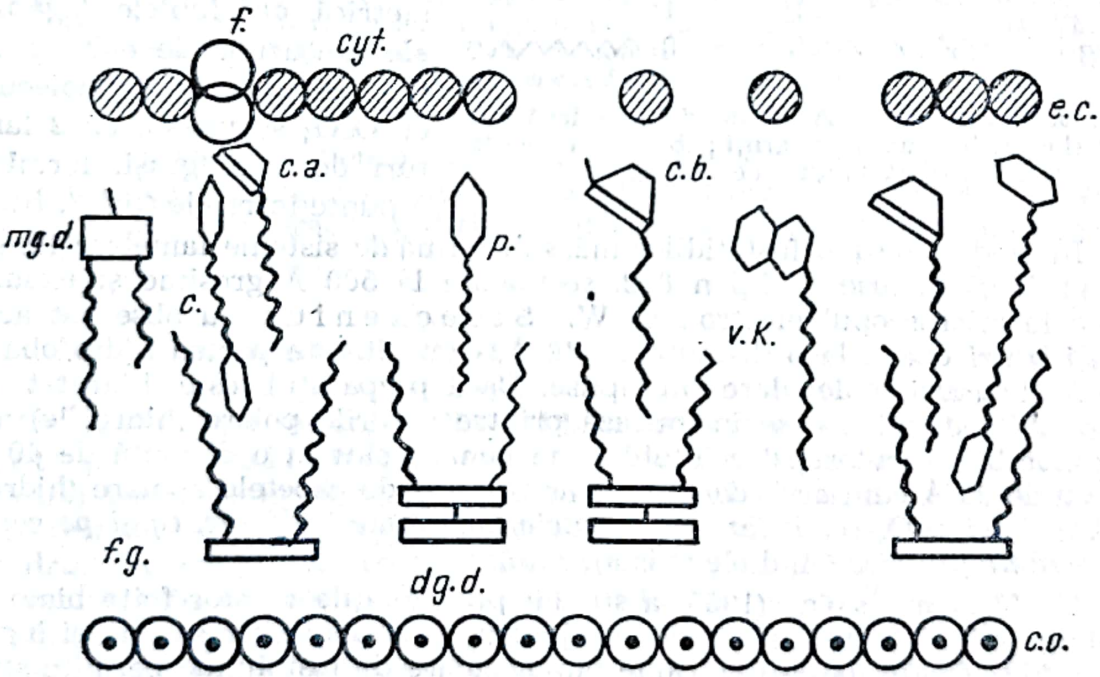


Fig. 7. Reprezentarea în simboluri a structurii membranei interne a cloroplastelor :

e.c. — enzimele reacției de carboxilare ; *f.* — feredoxină ; *cyt.* — citocrom ; *c.o.* — enzimele legate de degajarea O_2 ; *mg.d.* — monogalactozil-diglicerid ; *f.g.* — fosfatidil-glicerid ; *dg.d* : — digalactozil-diglicerid ; *c.* — caroten ; *p.* — plastochinonă ; *c.a.* și *c.b.* — clorofilă *a* și *b* ; *vK* — vit. K_1.

Scanned with OKEN Scanner

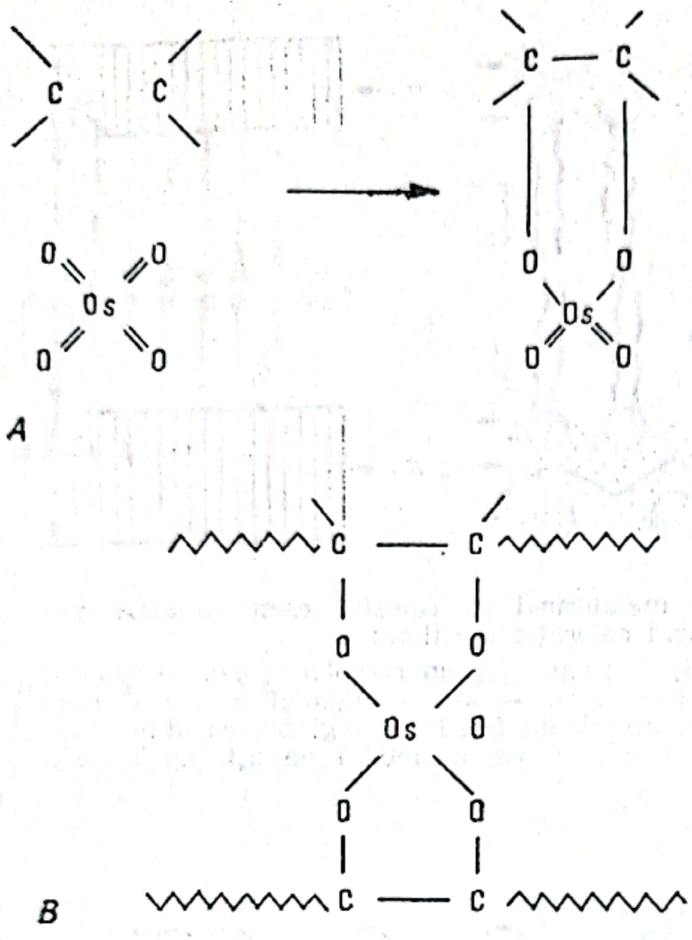


Fig. 8. Fixarea Os : *A* — de dublele legături ale lanțurilor acizilor grași ; *B* — cu punți între două lanțuri de acizi grași.

în glutaraldehidă, după care delipidizarea s-a făcut cîteva ore în cloroform-metanol (2 : 1), ca și în același amestec acetifiat. Apoi țesutul a fost trecut într-o soluție 4% OsO_4 și tetraclorură de carbon (s-a spălat cu tetraclorură de carbon, a fost deshidratat în etanol și inclus în Epon 812). Structura trilamelară se păstrează deoarece glutaraldehida a fixat materialul proteic și nelipidic. Dacă în cursul delipidizării țesutul se hidratează, atunci materialul proteic al membranelor se dizolvă și nu se păstrează structura lor trilamelară. În cazul fixărilor directe cu OsO_4, osmiul este redus în proporție stoichiometrică de dublele legături ale lanțurilor de acizi grași (fig. 8, *A*), sau o moleculă de OsO_4 se unește cu 2 lanțuri de acizi grași, formînd o punte între ele (fig. 8, *B*).

În modele de *L* α-fosfatidilcolină, sub formă de sisteme lamelare fixate în OsO_4 și incluse în Epon 812, secționate la 500 Å grosime și examinate la microscopul electronic, W. Stoeckenius a observat aceleași benzi opace la o distanță de 40 Å, cam cît este partea hidrofobă a două structuri moleculare suprapuse. Dacă preparatul este hidratat în prealabil, atunci apa se insinuează printre păturile polare (hidrofile) ale foițelor bimoleculare, dar întotdeauna benzile sînt la o distanță de 40 Å și nu de 60 Å cum ar fi dacă OsO_4 ar fi redus de dapetele apolare (hidrofobe). *Deci* OsO_4 *se fixează de capetele polare ale lipidelor, ca și pe componentele proteice* (cînd ele există).

T. Thompson (1965) a studiat proprietățile acestor foițe bimoleculare artificiale de fosfolipide cu ajutorul unui dispozitiv simplu și ingenios (fig. 9). Formarea unei foițe bimoleculare de fosfolipide permite studierea conductibilității soluției, deci a proprietăților electrice ale modelului experimental, ca și fixarea ei pentru examinare la microscopul electronic. Asemenea foițe au o rezistență electrică mai mare [$(1{,}0 \pm 0{,}5) \times 10^{\circ}$] decît a membranelor naturale [10^2—10^5 (1Kc) Ω cm^2]. În schimb, celelalte proprietăți electrice sînt asemănătoare cu ale membranelor vii. Numai tensiunea superficială este ceva mai mică din cauza lipsei protei-

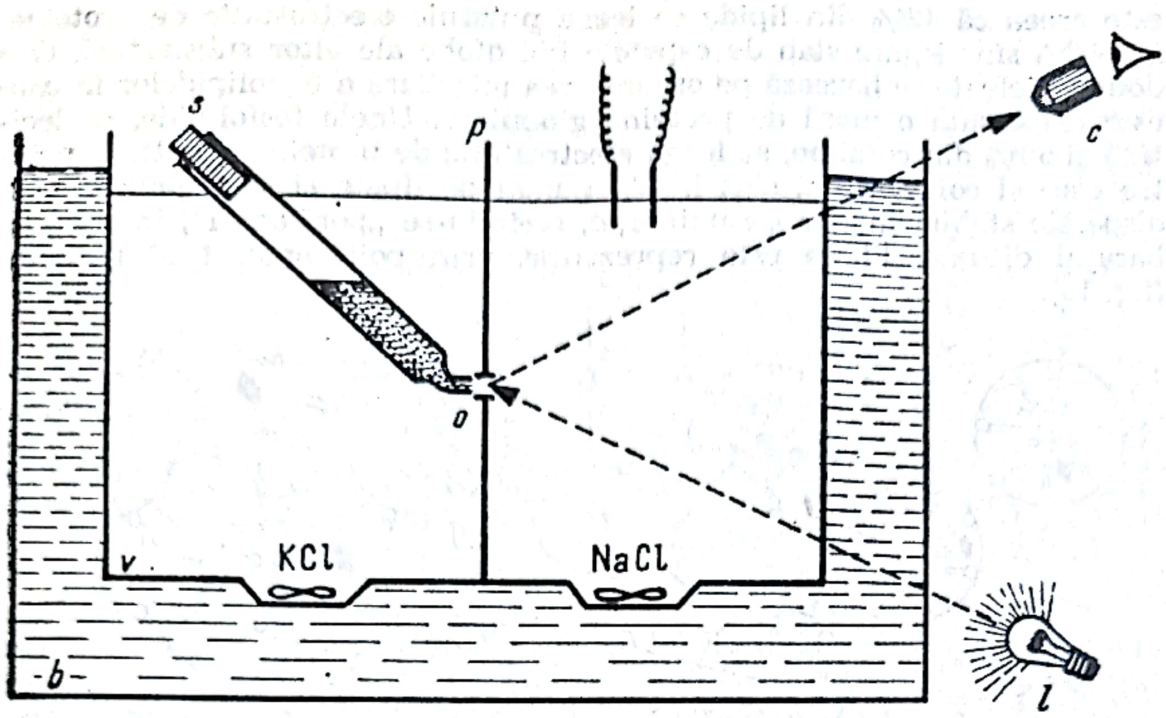


Fig. 9. Într-o baie de apă (*b*) cu temperatură constantă se află un vas (*v*) compartimentat în două printr-un perete de teflon (*p*) care are un mic orificiu (*o*) de 2 mm Ø. Cu o seringă (*s*) se introduce o soluție de fosfolipid în *n*—decan, exact în orificiul *o*. Acesta este luminat de o sursă (*l*) și, prin catetometru (*c*), se poate vedea cum lipidul dă culori de interferență cu lumina reflectată pe el. Cînd stratul de lipid se reduce la două filme monomoleculare, atunci apare o culoare neagră, secundară.

nelor. Bineînțeles, asemenea foițe bimoleculare artificiale de fosfolipide n-au proprietăți biologice. Valinomicina schimbă proprietățile electrice ale unor astfel de membrane artificiale, tot așa cum influențează și pe cele naturale.

1.1.2. MODELE DE STRUCTURĂ MICELIARĂ

Au fost propuse începînd din 1952, în urma studiilor lui A. Pappart și R. Ballentine, care au găsit în membranele eritrocitare trei feluri de lipide, după cum au folosit diferiți solvenți de polaritate crescută : *a) lipide ușor legate de membrană* extrase cu eter etilic anhidru. Ele conțin tot colesterolul membranelor, 25% din cefaline și reprezintă 44% din masa lipidică totală ; *b) lipide slab legate de membrană,* extrase cu un amestec de piridină-eter anhidru, acetonă-eter anhidru sau eter etilic saturat cu apă (30%). Conțin 25% din cefaline și reprezintă 14% din masa lipidică ; *c) lipide puternic legate de membrană,* extrase cu amestecuri polare acetonă-eter etilic-apă (3 : 1 : 0,1) sau acetonă-alcool-apă (3 : 1 : 0,1). Conțin toate lecitinele, sfingomielinele și 50% din cefaline. Ele reprezintă 42% din masa totală a lipidelor.

În lipidele slab legate găsim o parte din fosfolipidele membranei și foarte multe fosfotidiletanolamine. O primă concluzie care se desprinde

Scanned with OKEN Scanner

este aceea că 42% din lipide se leagă puternic electrostatic de proteine, iar 44% sînt legate slab de capetele hidrofobe ale altor substraturi. O a doua concluzie se bazează pe organizarea miceliară a fosfolipidelor în care este dispersată o masă de proteine globulare. Unele fosfolipide, ca lecitina şi 50% din cefaline, se leagă electrostatic de proteine iar altele, printre care şi colesterolul, sînt legate numai de lipide şi se organizează în dispersie stabilă în apa de imbibiţie, creîndu-se „pori apoşi", în timp ce barajul difuziei libere este reprezentat prin polii apolari ai lipidelor (fig. 10).

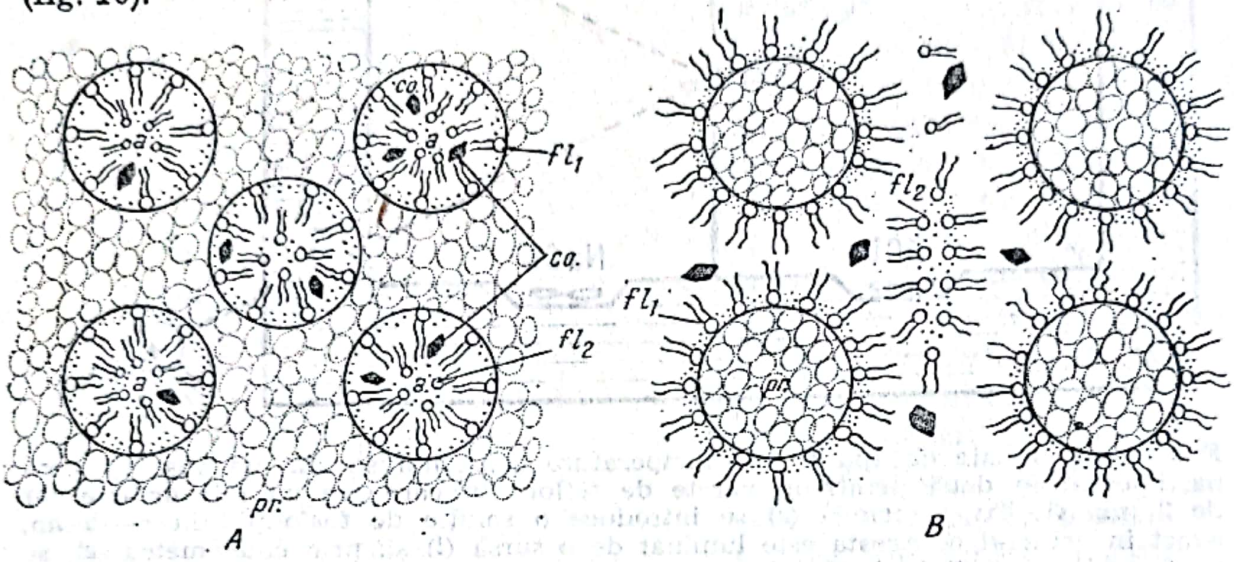


Fig. 10. Diagrama structurii miceliare a membranei : *A* — în secţiune paralelă cu suprafaţa ; *B* — în secţiune perpendiculară pe grosimea membranei : fl_1 — fosfolipide strîns unite cu proteinele ; fl_2 — fosfolipide slab unite ; *co.* — colesterol ; *a.* — apă ; *pr.* — proteine în masa globulară suprapusă.

În felul acesta apare problema legăturilor dintre lipide şi proteinele membranei, care se poate studia numai prin metode fizico-chimice moderne. În orice caz, aceste legături sînt întotdeauna slabe, chiar dacă este vorba de interacţiuni electrostatice, legături de hidrogen sau legături hidrofobe van der Waals. În nici un caz nu se stabilesc legături covalente.

S-au creat modele experimentale cu micelii de fosfatidilglicerol sau fosfatidilinozitol, încărcate negativ cu protamine, histone, cytocrom-*c* încărcate pozitiv. Ele au fost solubilizate la *p*H-uri inferioare punctului izoelectric, deci erau încărcate pozitiv. În soluţii apoase, la concentraţii mari şi *p*H-uri adecvate la care se realizează asemenea micelii, se obţine un strat bimolecular întins sub forma de strat lichid. Lanţurile hidrocarbonice manifestă aceeaşi flexibilitate ca şi lanţurile peptidice. Mişcările moleculelor lipidice sînt însă limitate deoarece capetele polare sînt nevoite să se mişte numai în planul interfeţelor hidrolipidice. În cadrul unor astfel de micelii proteinele sînt legate cu fosfatidilglicerofosfatul, prin legături polare sau printr-un complex de chelare în jurul Mg^{++} (fig. 11). Mg^{++} este chelat în acest caz de resturi de aminoacizi şi fosfolipide. Însă complexele artificiale de fosfolipide + proteine sînt *solubile* în solvenţi organici şi disociate în lichide polare cu forţă ionică mare (amoniac, soluţii

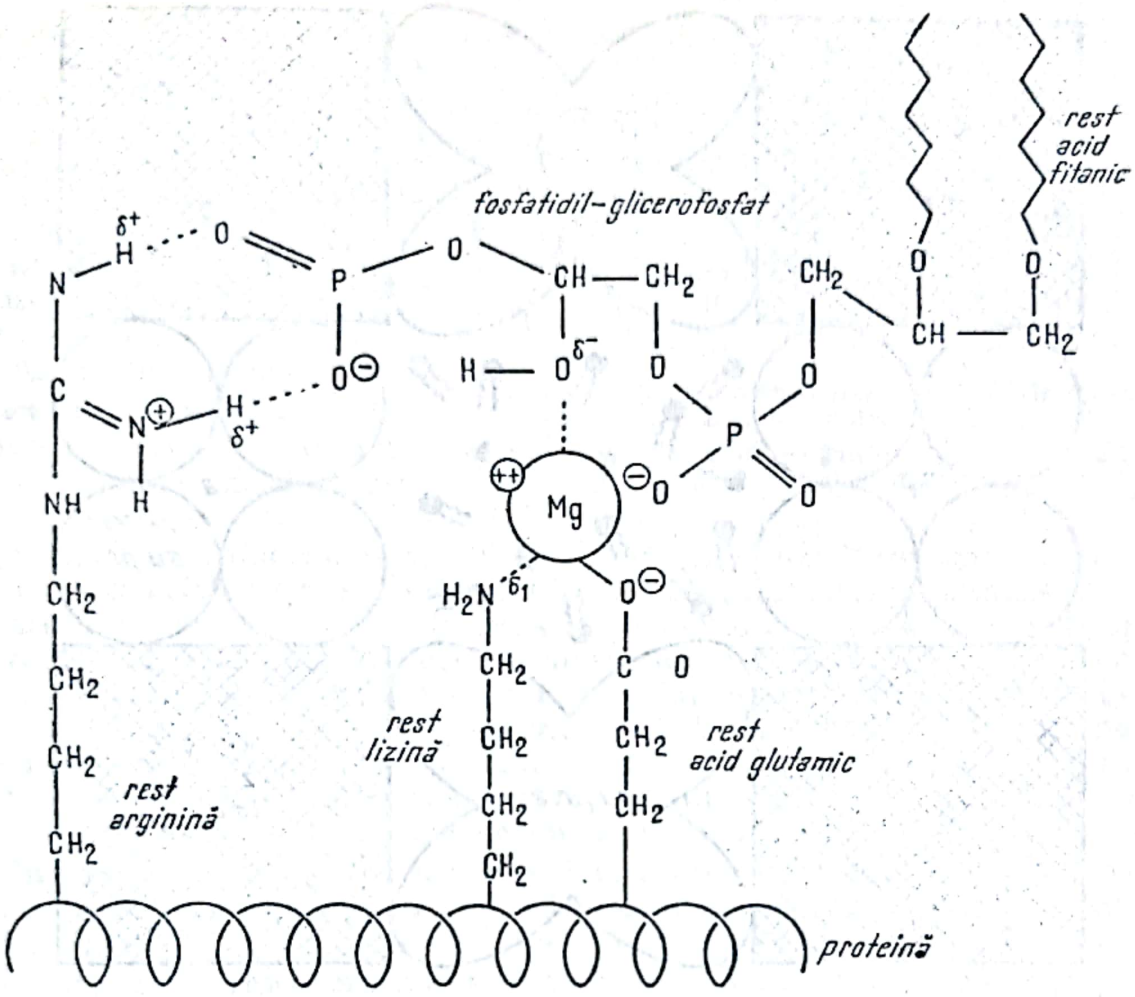


Fig. 11. Unirea proteinelor cu fosfatidil-glicerofosfatul prin legături polare sau printr-un complex de chelare în jurul Mg++.

saline), în timp ce membranele naturale sînt *insolubile* în solvenţi organici. Tratamentul cu cloroform rupe legăturile lipoproteinelor şi dizolvă numai lipidele din membrană. Comparîndu-se experimental dispersiile unui amestec de fosfolipide-colesterol în apă grea, cu a fragmentelor de membrană întregi şi tratate cu detergenţi, s-a putut stabili, prin *metoda rezonanţei magnetice nucleare,* că proteinele se leagă de lipide prin grupările $(CH_2)n$, $N^+(CH_3)_3$ şi HC═CH ale ultimelor. Prin *metoda dicroismului circular* s-a observat că 60% din structura proteinelor plasmalemei este de tipul α helix şi 40% una dezordonată.

După astfel de date membrana a fost imaginată ca un mozaic de zone apolare (lipidice) şi polare (proteinice). În zonele polare masele globulare proteice formează subunităţi. În aceste globule domină configuraţia α-helix, iar la suprafaţa lor cea dezordonată. Între subunităţile proteice sînt zone hidrofobe lipidice legate prin legături hidrofobe în adîncime şi electrostatice spre suprafeţe (fig. 12). Obţinerea unor spectre în infraroşu a membranelor eritrocitare, care au o bandă amidă C — NH — în jur de
‖
O

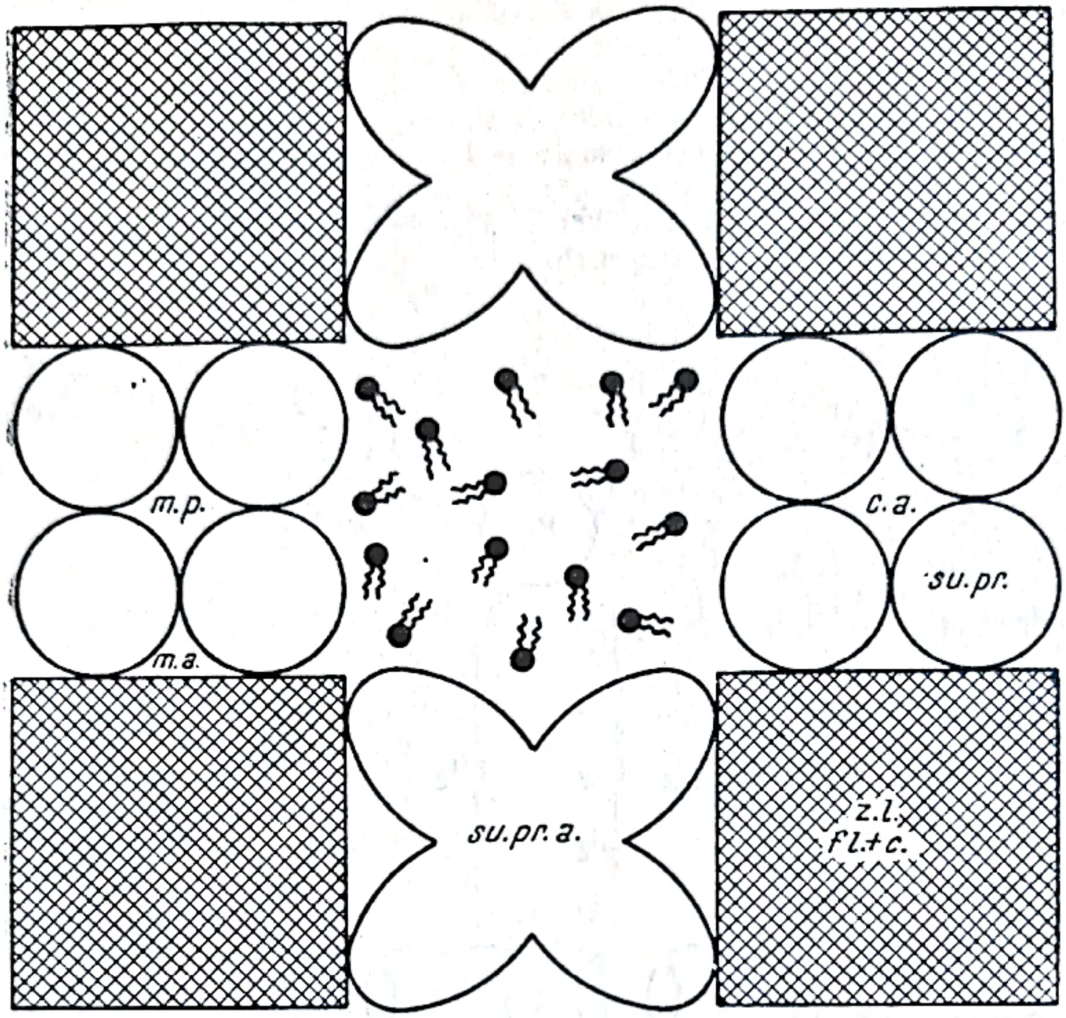


Fig. 12. Diagrama modelului miceliar de membrană vie : *su.pr.a.* — subunităţi proteice alipite ; *z.l.* — zonă lipidică ; *fl.+c.* — fosfolipide + colesterol ; *su.pr.* — subunităţi proteice ; *c.a.* — canalicul apos ; *m.a.* — margine apolară ; *m.p.* — margine polară.

1650 cm^{-1}, indică o configuraţie dezordonată sau helicoidală, lipidele reacţionînd cu proteinele prin grupările lor $(CH_2)n$.

Studiile electronmicroscopice asupra unor dispersii de fosfolipide şi colesterol, colorate negativ, arată că ele se prezintă sub forma unor micelii globulare orientate într-o structură hexagonală. Lucy şi A. Glauert (1964) au constatat că lipidele şi proteinele pot fi separate spaţial în faze distincte, aşa că membrana apare ca un mozaic de regiuni pur lipidice şi de regiuni pur proteinice, cu pori apoşi între micelii (fig. 13).

Studiile lui F. Sjöstrand asupra structurii plasmalemei, făcute la mari măriri ale microscopului electronic, care i-au permis elaborarea unei concepţii asupra arhitectonicii macromoleculare, par să explice plasticitatea membranelor vii. Pentru el membrana rezultă din coalescenţa unei populaţii de unităţi globulare. Fiecare globul, de natură proteică, are un centru hidrofob cu aminoacizi în α-helix, un înveliş ecuatorial tot hidrofob şi două calote polare de aminoacizi cu funcţiile secundare. Fosfolipidele stau cu resturile de acizi graşi nesaturaţi înfipte în globul,

iar capetele lor polare se acumulează pe calote şi prin interstiţii (fig. 14). Globulele se rotesc în aşa fel că marginile lor vin în contact cu marginile altora, explicîndu-se astfel reacţiile multienzimatice coordonate şi transportul electronilor prin membrane.

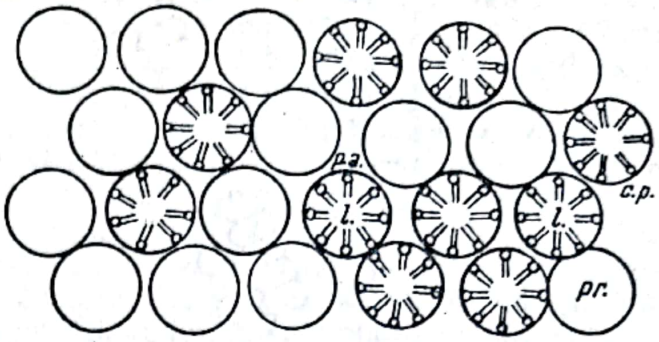


Fig. 13. Model de membrană miceliară în mozaic neregulat :
c.p. — cap polar ; *pr.* — proteine ; *l.* — lipide ; *p.a.* — por apos.

Astfel, membranele sînt concepute ca agregate complexe lipoproteice, disociabile şi reasociabile datorită existenţei proteice. Legăturile proteinelor cu lipidele sînt hidrofobe, ele stabilindu-se între lanţurile parafinice ale acizilor graşi şi aminoacizii apolari ai miezului proteinelor globulare. Această concepţie se bazează şi pe faptul că un lanţ polipeptidic în soluţie apoasă prezintă fiecare grupare apolară —CH_2 înconjurată de un „nor" de molecule de apă *organizată* (structurată) datorită caracterului apolar al grupării — CH_2 — introdusă în apă. Cînd lanţul devine ghem şi aminoacizii apolari se află în centru, apa pleacă din el iar în rest moleculele ei sînt dispuse dezordonat. În interiorul unui astfel de filament-ghem hidrofob creşte entropia şi configuraţia lui este stabilă.

Introducerea în metoda secţionării ultrafine a criogravurii a însemnat un pas înainte în studierea la microscopul electronic a membranelor. D. Branton şi R. Park (1967), cercetînd suprafeţele tilakoizilor din cloroplaste, descoperă mai multe aspecte. Astfel, suprafeţele examinate sînt „pînze de fractură" de minimă rezistenţă, atît la exteriorul cît şi la interiorul membranelor. Faţa *B* apare relativ netedă, avînd împrăştiate pe ea particule mari de 16—20 Å. Natura acestei suprafeţe a fost detectată histochimic ca fiind galactolipidică. Faţa *A* există numai cînd tilakoizii se dispun sub formă de teancuri (granum) şi este presărată cu particule mici de natură lipoproteică. Faţa *C* este presărată cu particule de 175 Å de clorofilă dar şi cu particule mai mici.

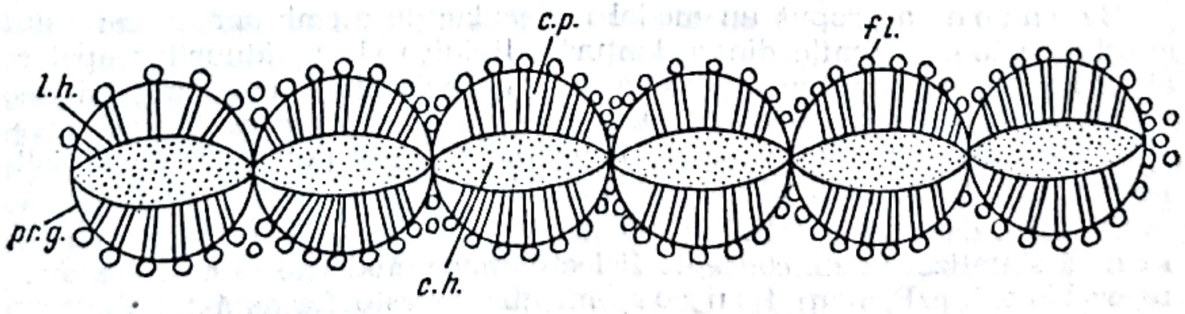


Fig. 14. Modelul de membrană a lui Sjöstrand. Proteinele globulare (*pr.g.*) prezintă un centru hidrofob (*c.h.*), cu aminoacizi în α-helix apolari şi două calote polare (*c.p.*) cu aminoacizi cu funcţii secundare, ionizate. Fosfolipidele (*fl.*) stabilesc legături hidrofobe (*l.h.*) cu centrul proteic al globulelor.

Scanned with OKEN Scanner

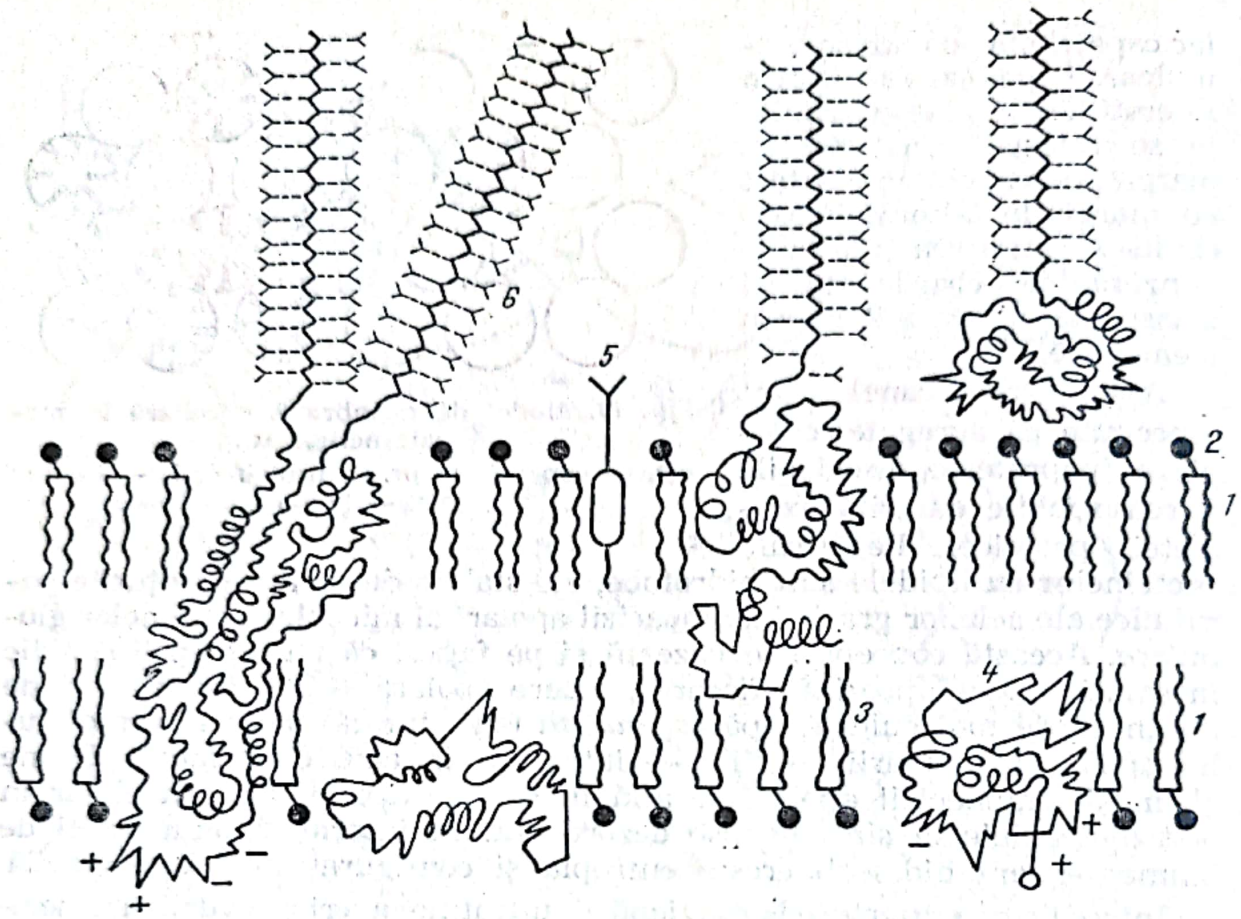


Fig. 15. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a membranei celulare. Fosfolipidele (*1*) stau într-un dublu strat care formează un mozaic fluid ; grupările fosfatice (*2*) polare ale moleculelor sînt îndreptate spre exterior, în timp ce lanţurile de acizi graşi (*3*) stau la interior. Zona centrală este nepolară şi ne apare ca o bandă clară la microscopul electronic, iar radicalii fosfatici ca două pături dense. Proteinele globulare stau plasate mai mult sau mai puţin în interiorul matricei hidrofobe de unde se pot deplasa (*4*). Glicolipidele (*5*) sînt înfipte prin partea lor nepolară în mozaicul fluid lipidic, iar la exterior rămîne un dublu oligozaharid cu activitate uneori antigenică. Glicoproteinele (*6*) formează aşa-zisul „înveliş dulce celular" şi se ridică mult deasupra suprafeţei membranare. Lanţurile glucidice se leagă de cele proteice, adică moleculele glucidice se dispun perpendicular pe lanţurile proteice desfăşurate, care provin la rîndul lor din proteinele globulare ale membranei (după R. Lambert).

Branton a propus un model molecular de membrană în care sînt exprimate interacţiunile dintre lanţurile lipidice şi „reziduurile" apolare ale proteinelor globulare hidrofobe (lanţ de acizi graşi nesaturaţi şi resturi aromate ale aminoacizilor). De asemenea, a luat în consideraţie interacţiunile polare dintre „capetele polarizate" ale moleculelor de fosfolipide şi reziduul polar al proteinelor (fig. 15).

Modelul de mozaic lichid al lui S. J. Singer şi G. L. Nicolson a sintetizat unele concepte fizico-chimice moderne asupra membranelor biologice. Pentru Singer membrana este formată tot dintr-un strat dublu de molecule lipidice care include diferite molecule proteice ce pot sau nu traversa toată grosimea lipidelor. Acestea sînt constituite din fosfolipide care au proprietatea să formeze în apă dispersii de pînze

Scanned with OKEN Scanner

bimoleculare. Moleculele lipidice prezintă o serie de mişcări : unele rapide în interiorul lor, altele laterale prin care moleculele difuzează cu viteze felurite în acelaşi plan şi, în fine, mişcări de rotaţie rapidă în jurul axului mare al moleculei. În plus, există un „du-te-vino" de molecule de la un strat lipidic la altul. Toate aceste mişcări depind de temperatură, deoarece încălzind fosfolipidele ele suferă o tranziţie endotermică la o temperatură cu mult inferioară punctului real de topire care este de 200°C. La temperatura de tranziţie are loc o schimbare a stării lipidice care din gel trece în cristal lichid. Asemenea modificare de la starea cristalină (gel) la cea de cristal lichid s-a numit şi „topire" a lanţurilor hidrocarbonate. Astfel, sub temperatura de tranziţie, în faza cristalină (gel) fosfolipidele se dispun într-un strat dublu, în care lanţurile de acizi graşi sînt asamblaţi în hexagoane ordonate în care lanţurile stau drept şi strînse (anizotrop). La temperatura de tranziţie suprafaţa ocupată de stratul bimolecular creşte cu 50%, iar lanţurile se îndoaie deoarece au loc mişcări în jurul legăturilor —C—C— ale acizilor graşi. Coeficientul de difuzie rotaţională al unei astfel de mişcări este de $7 \times 10^9 S^{-1}$ şi asemenea rotaţii axiale ale moleculei lipidice au loc în planul dublului strat molecular. Mişcările rapide de difuzie a moleculelor lipidice în planul dublului strat au o valoare mare, de 7×10^{-7} cm^2 S^{-1}, adică o distanţă de 1 μ poate fi străbătută de o moleculă în cîteva secunde. În schimb, trecerea lipidelor dintr-o parte într-alta a dublului strat are loc în cîteva ore. În membranele biologice starea de gel împiedică trecerea moleculelor mici pe care starea de cristal lichid o permite.

S-a stabilit că temperatura de tranziţie creşte cu lungimea lanţului acizilor graşi şi descreşte cu gradul de nesaturaţie al lanţului. Bazaţi pe aceste observaţii, s-a constatat că dacă se ridică temperatura de creştere a culturilor bacteriene lanţurile acizilor graşi se alungesc iar gradul de nesaturaţie scade. Este, de fapt, o adaptare a bacteriilor la mediu prin care ele îşi păstrează o anumită „fluiditate" a membranei. În asemenea amestecuri de lipide, cum sînt cele din membranele biologice, s-a calculat că o moleculă de colesterol este înconjurată de 7 lanţuri de acizi graşi, raportul fazei mixte lecitină-colesterol fiind de 2/1. În afară de această fază mixtă de cristal lichid mai există şi o fază de gel cu lecitină pură. Efectul colesterolului este de a reduce permeabilitatea dublelor straturi de lipide în faza de cristal lichid şi de a reduce libertatea de mişcare a moleculelor lipidice, iar membranele plasmatice au mai mult colesterol şi acizi graşi saturaţi decît sistemul de membrane intracelulare, constituind o barieră serioasă în schimburile cu exteriorul.

A. G. Lee (1975) apreciază că cel puţin unele proteine membranare sînt înconjurate de o pătură lipidică necesară activităţilor proprii. Într-adevăr, unele lipide sînt necesare cîtorva reacţii enzimatice. S-a întrebuinţat ca model experimental reticulul sarcoplasmic cu „pompa sa de calciu" [ATP-aza (Ca^{2+}—Mg^{2+})] la care s-au înlocuit toate lipidele membranare cu lecitin-dioleoil, lecitin-dimiristoil şi lecitin-dipalmitoil. Temperatura de tranziţie este pentru lecitin-dioleoil de 20°C, pentru lecitin-dimiristoil 24° şi pentru lecitin-dipalmitoil de 42°C. Ori ATP-aza cu lecitin-dioleoil substituit lipidelor membranare este activă la temperaturile de 10°—30°C, ATP-aza cu lecitin-dimiristoil este activă la peste 24°C, iar ATP-aza substituită cu lecitin-dipalmitoil începe să fie activă de la 30°C.

Scanned with OKEN Scanner

Deci proteina transportoare nu mai are activitate ATP-azică atunci cînd lipidele care o înconjură sînt în fază de gel, adică sub temperatura de tranziţie. Această activitate enzimatică poate fi menţinută cu o singură „specie" de lipide, celelalte lipide membranare folosind la oprirea „fugii" pasive a Ca^{2+} din reticulul sarcoplasmic. Pe de altă parte, lipidele încărcate negativ (fosfatidil-serina, acidul fosfatidic) şi ionii metalici bivalenţi produc aglomerarea lanţurilor lipidice ale acizilor graşi şi scăderea activităţii enzimatice a enzimelor asociate lor.

Funcţionarea corectă a enzimelor legate de membrană este în funcţie de fluiditatea lipidelor membranare. Proteinele sînt dispuse, după unii autori, la întîmplare în membrană şi viteza lor de difuzie prin translaţie în dublul strat lipidic este de 10—100 ori mai mică decît a moleculelor lipidice. M. Poo (1974) a găsit însă că viteza de difuzie a rodopsinei în membrana bastonaşelor retiniene este la 20°C de 4×10^9 $cm^2\ s^{-1}$, care corespunde la o frecvenţă de ciocnire moleculară de 10^5—10^6 pe secundă. În bastonaşe Ca^{2+} este liberat prin absorbţia luminoasă şi el declanşează excitaţia celulei. Pompa de calciu a celulelor cu bastonaşe furnizează un ionofor Ca^{2+} care, ciocnindu-se de rodopsină, eliberează Ca^{2+}, iar acesta, la rîndul său, excită celula.

Difuzia în membrană influenţează şi funcţionarea receptorilor membranari. Astfel, în celula adipoasă, chiar adenilat-ciclaza este inhibată de 3 hormoni şi stimulată de 7 hormoni diferiţi. Or, acest lucru se explică imaginîndu-se receptorii membranari hormonali asociaţi temporar cu adenilat-ciclaza şi funcţionînd doar atunci cînd se întîlnesc cu ea în cadrul difuziei lor prin membrană.

W. Kreuz (1972, 1976) a elaborat un alt model membranar mai aprofundat, bazîndu-se pe studii biofizice. Astfel, calculul repartiţiei densităţii de electroni pe membranele cloroplaştilor, mitocondriilor şi tecii de mielină a dus la o structură asimetrică a acestor membrane. Bazîndu-se pe structura specifică a membranei fotosintetizante, a postulat principiul general de *cuplare a componentelor biomembranelor*, care s-a putut verifica şi în cazul membranei mielinice prin cercetări cu raxe X. Dacă luăm în considerare, în această reprezentare, proprietăţile lipidelor şi proteinelor aşa cum reies ele din cercetările de chimie comparată, putem defini biomembranele ca fiind constituite dintr-o reţea proteică şi din lipide membranare.

În secţiune transversală structura din regiunile unde proteinele cuplează cu lipidele este complet asimetrică, iar în regiunile cu lipide este simetrică. Cuplarea dintre proteine şi lipide are loc prin intermediul fosfatidil-colinei şi lecitinei. Într-un domeniu de mărime între 42—93 Å, cît este unitatea unei structuri proteice, mai au loc să intre în cadrul ei numai 78—80 de molecule lipidice. Pentru a se cupla aceste molecule cu proteinele, au la dispoziţie 30 molecule de fosfatidil-colină, pentru fiecare inel de structură proteică 15, 8 pe o parte, iar pe altă parte a inelului 7. Dacă sînt asamblate laolaltă aceste 7 molecule de lipide se poate acoperi un spaţiu de 35—75 Å de acizi graşi, care formează un lanţ simplu sau dublu. Deoarece structura proteică inelară are un diametru de 30 Å, aşezarea este foarte posibilă să fie într-un şir dublu (fig. 16, *A*). Dar molecula de fosfatidil-colină cuplează şi cu o altă moleculă lipidică, astfel că pe o

Scanned with OKEN Scanner

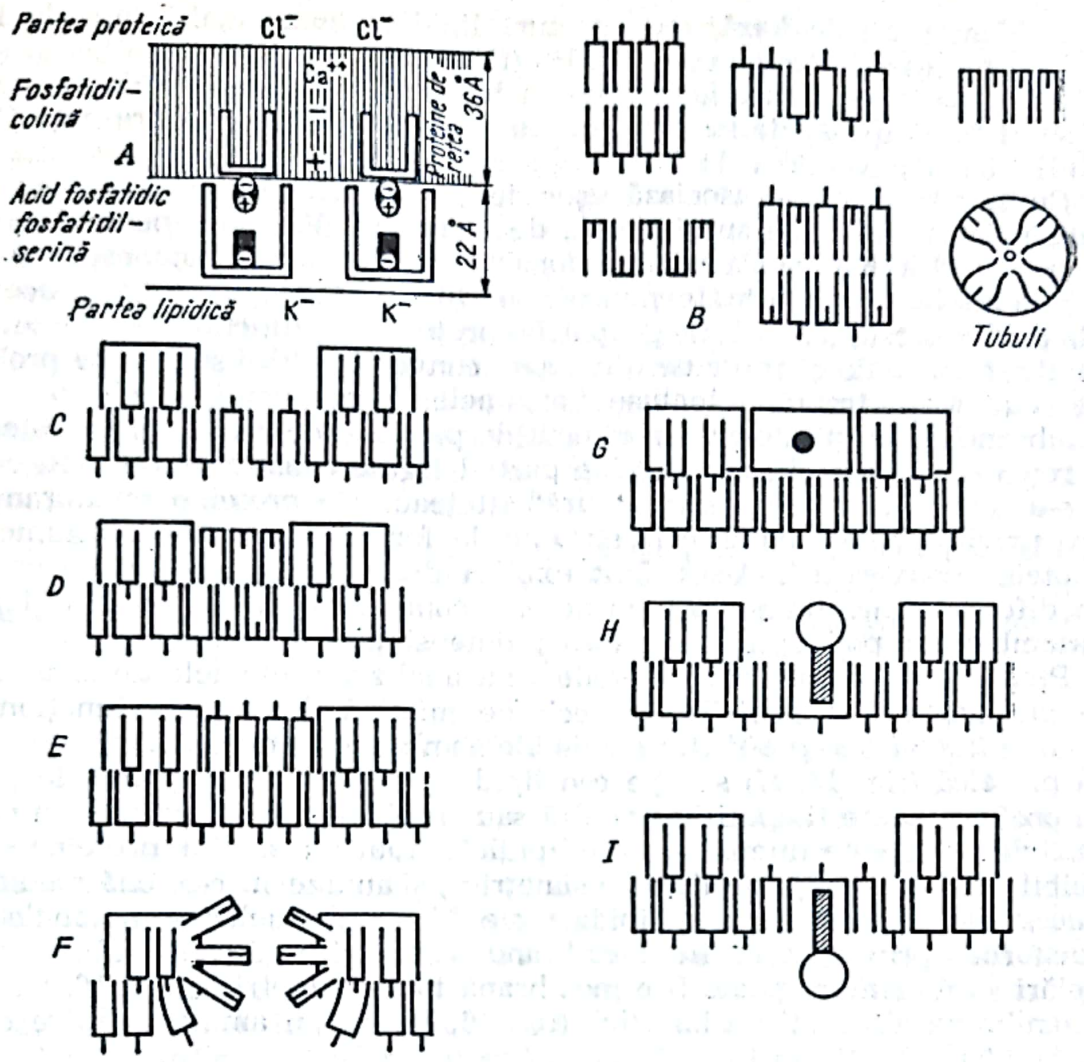


Fig. 16. Modelul de membrană W. K r e u z. (Explicația în text.)

suprafață de 42—93 Å mai rămîn 50 molecule lipidice necuplate. Pentru acestea rezultă cu necesitate o structură miceliară (fig. 16, *B*). De aici rezultă, în funcție de arhitectonica lipidelor, următoarele aspecte ale structurii biomembranelor :

1. Membrana fundamentală are zone intermediare de lipide cu structură monomoleculară simetrică și conformații omogene P_{ex}. (gruparea polară la exteriorul lanțului de acizi grași). În compoziția acestor zone intermediare intră acidul fosfatidic (PA), fosfatidil-etanolamina (PE) și fosfatidil-glicina (PG) (fig. 16, *C*).

2. Membrana fundamentală are domenii lipidice intermediare, bineînțeles pe lîngă cuplaje de lipide-proteine, în care straturile bimoleculare sînt simetrice și conformația lor este omogenă P_{ex}. Ele sînt constituite din PA, fosfatidil-serină (PS) și fosfatidil-inositol (PI) (fig. 16, *D*).

3. Membrana fundamentală are zone intermediare lipidice cu structură bimoleculară simetrică și conformație omogenă P_{in}. (grupările polare printre lanțurile acizilor grași) (fig. 16, *E*).

Scanned with OKEN Scanner

4. Membrana de bază, cu structuri lipidice hexagonale date de PE singură sau în amestecuri cu PA și PS (fig. 16, *F*).

Tipul de miceliu care ia naștere în biomembrane depinde de valoarea *p*H-ului fazei apoase de pe partea externă a membranei, de prezența CO_2 sau H_2CO_3 și de Ca^{2+}.

Substanțele care se asociază ușor de biomembrane sînt din categoria proteinelor funcționale speciale, ca, de exemplu, ATP-aza, pentru transportul activ de Na^+ și Ca^{2+} sau rodopsina membranelor bastonașelor retiniene; altele sînt substanțe neproteice ca NADP, ADP, ATP și acetilcolina. Se presupune că la grupările proteinelor funcționale legate de membrană aparțin și proteine din rețea, convertite (●). Este foarte probabil că aici trebuie incluse enzimele, cytocromii *f* și *b* din membranele cloroplastelor. Amestecul de proteine de rețea pure, proteine de rețea convertite și alte proteine parțial legate constituie, de fapt, ceea ce s-a numit „proteine de structură". Rețeaua de proteine membranare care prezintă unele modificări structurale formează ceea ce se numește „proteine convertite". Acest fapt explică de ce proteinele de structură din diferitele membrane au cam aceeași compoziție de aminoacizi și pot fi asamblate în polipeptide de aceleași dimensiuni.

Pînă acum, cu asemenea metode s-au analizat proteinele de structură ale plasmalemei, tilakoizilor și tecii de mielină. Proteinele funcționale asociate tilakoizilor pot fi cuplate de biomembrane în două feluri : pe partea proteică (fig. 16, *H*) sau pe cea lipidică (fig. 16, *I*). Cuplarea la partea proteică poate fi specific-proteică sau specific-lipidică, pe cînd la partea lipidică ea este numai specific-lipidică. Adausul acestor proteine este posibil numai la miceliile lipidice simetrice, și anume, într-o zonă mediană a acestora. Asemenea zone lipidice ale biomembranelor funcționale se transformă prin cuplare în membrane asimetrice. Rezultatul acestor cuplări suplimentare poate fi o membrană total asimetrică (fig. 16, *G*, *H*), o membrană alternativ asimetrică (fig. 16, *I*) sau un amestec dintre cele două.

1.2. COMPLEMENTELE SUPRAFEȚEI CELULARE

H. Bennett (1962) distinge două componente ale suprafeței celulare : una *internă* — plasmalema fosfolipo-proteică și alta *externă* — glicocalixul polizaharidic. În multe cazuri apar și structuri nevii secundare, cum sînt pereții celulozopectici ai plantelor, învelișurile mucoase ale blastomerelor, zona prelucidă și membrana radiată de la oocite, membranele bazale etc.

1.2.1. PLASMALEMA ȘI GLICOCALIXUL

Plasmalema rezistă la trecerea apei, ionilor și moleculelor hidrofile permițînd difuzia O_2, N_2 și CO_2 la un gradient de 10^6 — 10^7 V/m. Avînd o constantă dielectrică mare, înseamnă că rezistă la curentul electric direct. Fiind flexibilă și ușor deformabilă prezintă mișcări, se separă și se recombină instantaneu, refăcîndu-se brusc. În schimb, glicocalixul este străbătut ușor de apă, ioni și moleculele mici, avînd o rezistență electrică mică.

Scanned with OKEN Scanner

Glicocalixul are o natură glucidică și, spre deosebire de plasmalemă, o rezistență electrică mică. De el se leagă prin covalență aminoacizi, lipide, lignină, nucleotide și alți polimeri care, uneori, se impregnează cu CO_4Ca sau PO_4Ca. Însă ceea ce îl caracterizează este structura sa variabilă : de la mărimea, tăria și rezistența pereților celulari ai vegetalelor și pînă la un strat detectabil numai chimic, de pe suprafața eritrocitelor, există o gamă de toate mărimile La celulele vegetale, glicocalixul conține, pe lîngă polizaharide (celuloză, manani, xilani, galactani, arabani, fucoidină și heteropolizaharide), poliuronide (substanțe pectice, acid alginic și diferite mucilagii, gume ce conțin acid uronic), chitină și chitozan, lignină, lipide, ceruri, suberină, cutină, sporopolenină, proteine cu hidroxiprolină și o serie de oxizi și carbonați minerali. Asemenea substanțe complexe sînt organizate în *microfibrile* (de celuloză, xilani, manani, glucani, chitină). La animale, printre glucide se găsesc condroitin-sulfați, acizi sialic și hialuronic, care conferă celulei un înveliș de radicali anionici.

În ansamblul său, glicocalixul apare ca polimeri anionici care corijează proprietățile electrice ale membranei vii. Asociația strînsă dintre plasmalemă și glicocalix determină noi proprietăți suprafeței celulare în sensul protecției, reglării schimburilor și a activității ei.

1.2.2. MICROVILII ȘI DIFERITELE TIPURI DE GLICOCALIX

Microvilii. În unele cazuri, specializarea suprafeței plasmalemei a mers atît de departe încît s-au diferențiat structuri noi cum sînt *microvilii* și *cilii*. Microvilii sînt digitații de 1—2 μ care se întîlnesc la polul apical al enterocitelor, nefrocitelor, plexurilor coroidiene, celulelor foliculare etc. Ei au un ax fibrilar mai dens, iar suprafața lor este acoperită de așa-numitul *glicocalix antenular*, o „perie" moleculară de polizaharide filiforme, lungă de 1000 Å. O celulă intestinală are 3000 microvili, iar 1 mm^2 de suprafață internă a intestinului are 200 000 000 microvili care măresc enorm cei 5 m^2 ai suprafeței desfășurate a intestinului subțire.

La baza microvililor se găsesc *veziculele de pinocitare* prin care se înglobează lichide cu substanțe dizolvate din mediu (fig. 17). G. Palade (1953) a descris în endoteliul capilarelor de la vertebrate niște invaginații ale suprafeței celulare denumite de E. Jamade (1955) *caveole* (fig. 18), care au fost văzute și pe sinapsele nervilor ; formarea veziculelor pinocitare și fagocitare trebuie socotită ca începînd tot cu o invaginație caveolară. Veziculele exocitare rămase după ce s-a eliminat produsul de secreție sînt tot caveole. În asemenea cazuri, suprafața celulei se mărește de circa 10 ori. Dar cel mai interesant exemplu de specializare strictă numai a unei părți din membrană îl constituie invaginările sarcotubulare ale fibrei musculare striate care înconjură miofibrilele, prin care este condus impulsul excitant la miofibrile și prin care se eliberează Ca^{++} din reticulul endoplasmic, determinîndu-se astfel contracția.

Membrana celulară realizează pe fețele laterale adiacente dintre celule o serie de cute, îndoituri și falduri care solidarizează celulele. Astfel, nefrocitele segmentului proximal al tubului nefrotic prezintă falduri care

Scanned with OKEN Scanner

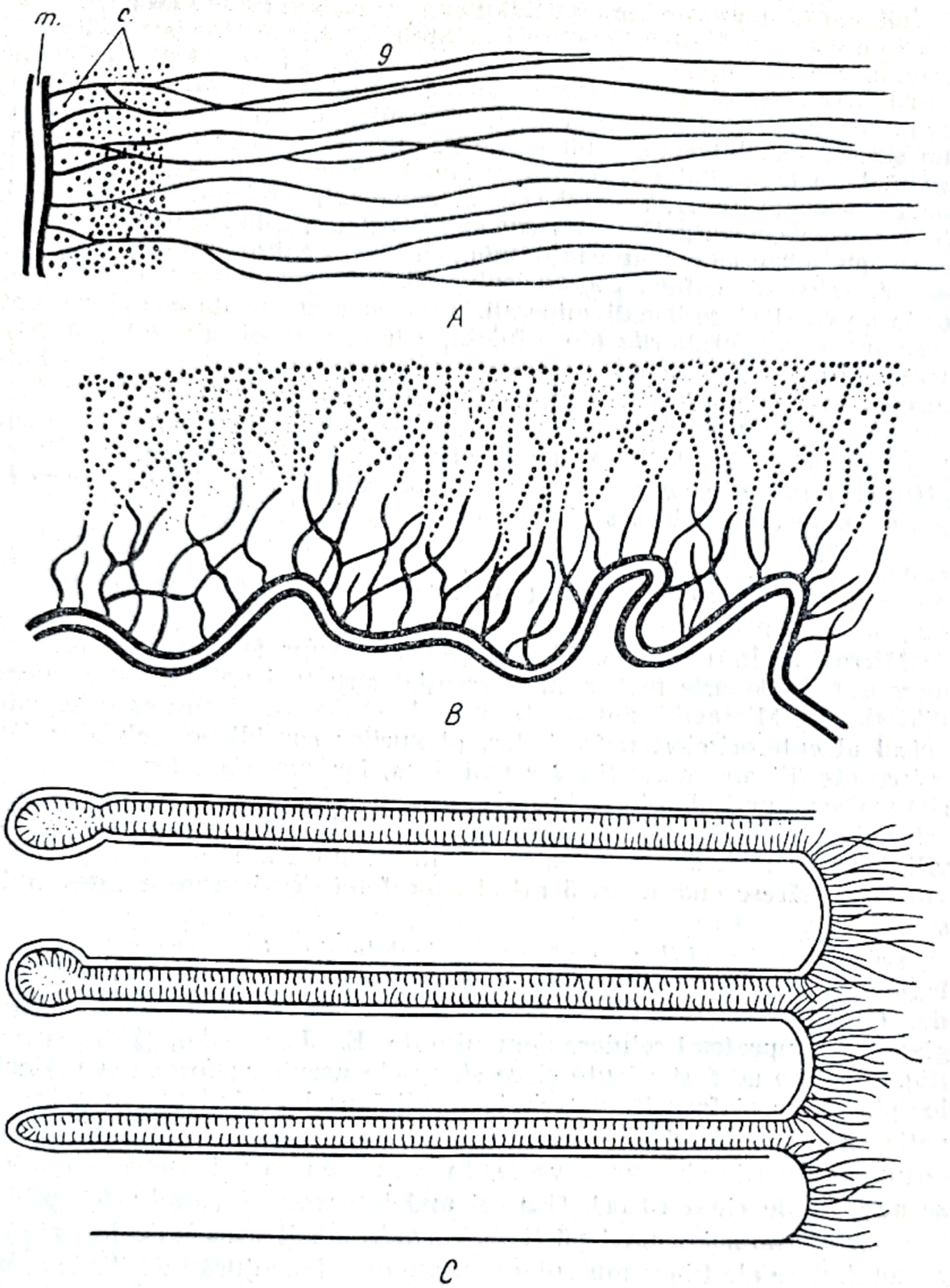


Fig. 17. A — antenule :
c. — citoplasmă ; *m.* — membrană celulară ; *g.* — glicocalix antenular cu un material granular la bază ;
B. — diagrama suprafeței celulei de la ciuperca *Neurospora* în care se vede cum peretele celular nu participă la încrețirile membranei celulare ; *C* — diagrama microvililor.

Scanned with OKEN Scanner

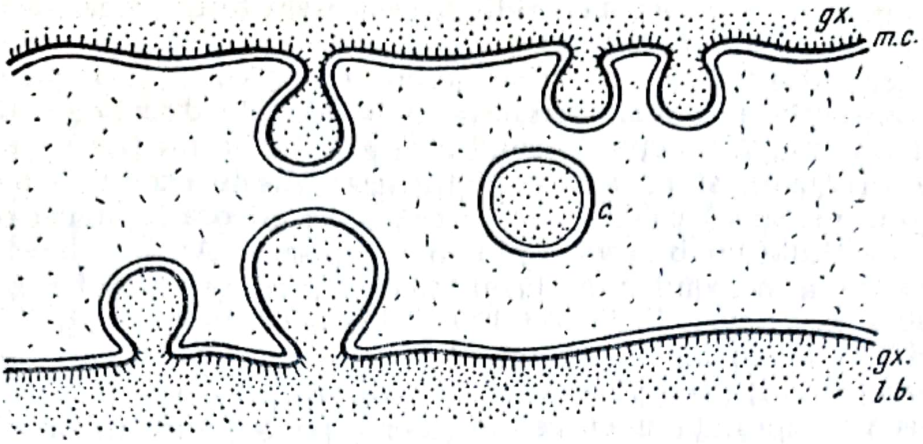


Fig. 18. Suprafața internă și externă a celulelor endoteliului capilar al vaselor de sînge de la vertebrate. Formarea caveolelor (*c.*) pe seama plasmalemei (*m.c.*); *gx.* — glicocalix; *l.b.* — lamina bazală (după Luft și Fawcett).

se imbrică cu cele ale celulelor învecinate, crescînd suprafața lor și menținîndu-le strîns unite unele de altele. În alte cazuri, membrana celulară a fibrei musculare striate prezintă o serie de îndoituri rezultate în dreptul plăcii motoare, constituind *aparatul juxtaneural* bogat în acetilcolinesteraze detectabile ușor histochimic. Prin asemenea falduri și interdigitații se realizează și un transport masiv de plasmă interstițială, deoarece asemenea dispozitive sînt bogate în ATP și în adenilat-ciclază, prezentînd în vecinătatea lor mitocondrii cu rol în sinteza ATP.

Tipuri de glicocalix. După relația strînsă sau labilă cu plasmalema se disting glicocalixuri *atașate* și *neatașate*.

Glicocalixul atașat este întîlnit la globulele roșii ale vertebratelor, la amibe, pe microvilii celulelor veziculei biliare, pe suprafața vasculară a hepatocitului, la fagocite etc., într-un cuvînt la celulele unde configurația suprafeței lor se schimbă antrenînd și glicocalixul. Amiba, de pildă, are un glicocalix lung — antenular — format din mucopolizaharide acide cu funcția de captare prin grupările lor anionice, care antrenează ioni, proteine, particule în cursul fagocitării și pe care le transportă în veziculele formate (caveole). Enterocitele au un glicocalix foarte subțire, reprezentat în parte prin acid sialic și de alte mucopolizaharide determinate genetic, care caracterizează antigenic celula. Dealtfel, acidul sialic se găsește și pe suprafața hepatocitelor, a celulelor în culturi etc. unde poate fi evidențiat histochimic și electronmicroscopic cu toriu coloidal.

Glicocalixul neatașat constituie învelișul bacteriilor, al fungilor, al celulelor plantelor, al fibrelor musculare, al epiteliilor animale cu membrană bazală etc. Celulele endoteliale ale capilarelor au un glicocalix fin pe fața dinspre plasma sanguină și unul gros (membrana bazală), amîndouă putînd fi evidențiate electronmicroscopic cu roșu de ruteniu. Atît pe fața apicală cît și pe cea bazilară, membrana prezintă caveole. La *Neurospora* glicocalixul este o capsulă de 2000 Å grosime, cu o structură fibrilară, care încorsetează plasmalema plisată ce se mișcă independent de acest înveliș rigid.

Cum se poate vedea, o primă funcție a acestei formațiuni este pur mecanică. În concepția actuală, pereții celulelor vegetale sînt considerați

ca fiind un glicocalix, care dă rigiditatea necesară țesuturilor. La animale, substanța matriceală a mezogleii celenteratelor, cartilageina și oseina țesuturilor scheletice, trebuie considerate tot glicocalixuri, conform cu această concepție. Chiar și membranele bazale ale diferitelor tipuri de epitelii au, pe lîngă funcția de solidarizare (celulele nu pot fi smulse de curentul circulant), și pe aceea de filtrare. Vasele sanguine ale rîmei, care au o membrană bazală foarte groasă și un glicocalix apical ceva mai subțire, constituie un bun exemplu în acest sens. Analiza biochimică a lamei bazale a nefronilor arată următoarea compoziție : tropocolagen 0,6% sub forma unor fibrile de 100 Å periodicitate, hidrați de carbon 10%, acid sialic 2,1%, hexozamine 1,4%, fucoză 0,75%, hexoze 5,52%. Un rol lubrefiant îl joacă glicocalixul mucoproteic, care formează un înveliș mucos pe suprafața unor celule libere, pe tegumentul amfibienilor, turbelariatelor sau branhiilor peștilor etc.

Ca o concluzie privind funcțiile glicocalixului, este de subliniat în primul rînd rolul lui *mecanic* (de solidarizare a celulelor, de creare a unor matrice intercelulare tari, de aderare la substrat în cazul deplasării celulelor libere, de „schelet" exocelular etc.) ; de *ungere* a suprafețelor ; de *legare chimică* complementară a proteinelor și ionilor în cazul endocitozei. Sub formă de membrană bazală, glicocalixul are rol de *filtru* : el determină mărimea particulelor ce urmează să treacă prin interstițiile podocitelor din glomerulul lui Malpighi sau limitează contactul dintre eritrocruorina și hemocianina din plasma nevertebratelor cu plasmalema endoteliului lor vascular. Deci, reține particulele mari să ajungă la membrana vie și împiedică enzimele să difuzeze rapid prin membrana vie în afară. El întîrzie trecerea ionilor mici, reducînd cererile „pompei" de ioni, mai precis de a intra K^+ în celulă și de a slăbi accesul Na^+ din interior spre membrană, pentru a fi pompat în afară. Glicoproteinele membranare ale enterocitelor și nefrocitelor sînt aminopeptidaze, cele intestinale fiind, în plus, și maltaze.

1.2.3. SOLIDARIZAREA CELULELOR

Desmozomii. Sînt o altă înfățișare pe care o iau anumite porțiuni mici ale membranei celulare ce realizează contacte strînse cu celulele adiacente sau cu substraturile extracelulare. Într-adevăr, între celule nu se stabilește niciodată un contact strîns între plasmaleme, existînd totdeauna un interval de 8—15 nm (fig. 19). Acest spațiu intercelular se realizează prin interacțiunea forțelor electrostatice care resping membranele cu aceeași sarcină bioelectrică cu a forțelor de atracție London-van der Waals. În cazul desmozomilor, în spațiul intercelular se găsește un material diferit prin aspectul său electronoptic de al substanței intercelulare. Foița externă a plasmalemei nu se modifică, ca și spațiul clar central, în schimb foița internă dinspre citoplasmă se îngroașă mult și de la ea pornesc microfibrile în citoplasmă.

Ca formă, se disting *desmozomi maculari (maculae adherentes)* mici, presărați din loc în loc între celule și *desmozomi zonulari (zonulae adherentes)* care înconjură de jur-împrejur celulele, încastrîndu-le într-un fel de bare terminale în dreptul polului apical. Asemenea legături se pot stabili între suprafețele aceleiași celule *(autodesmozomi)*, între celule de

Scanned with OKEN Scanner

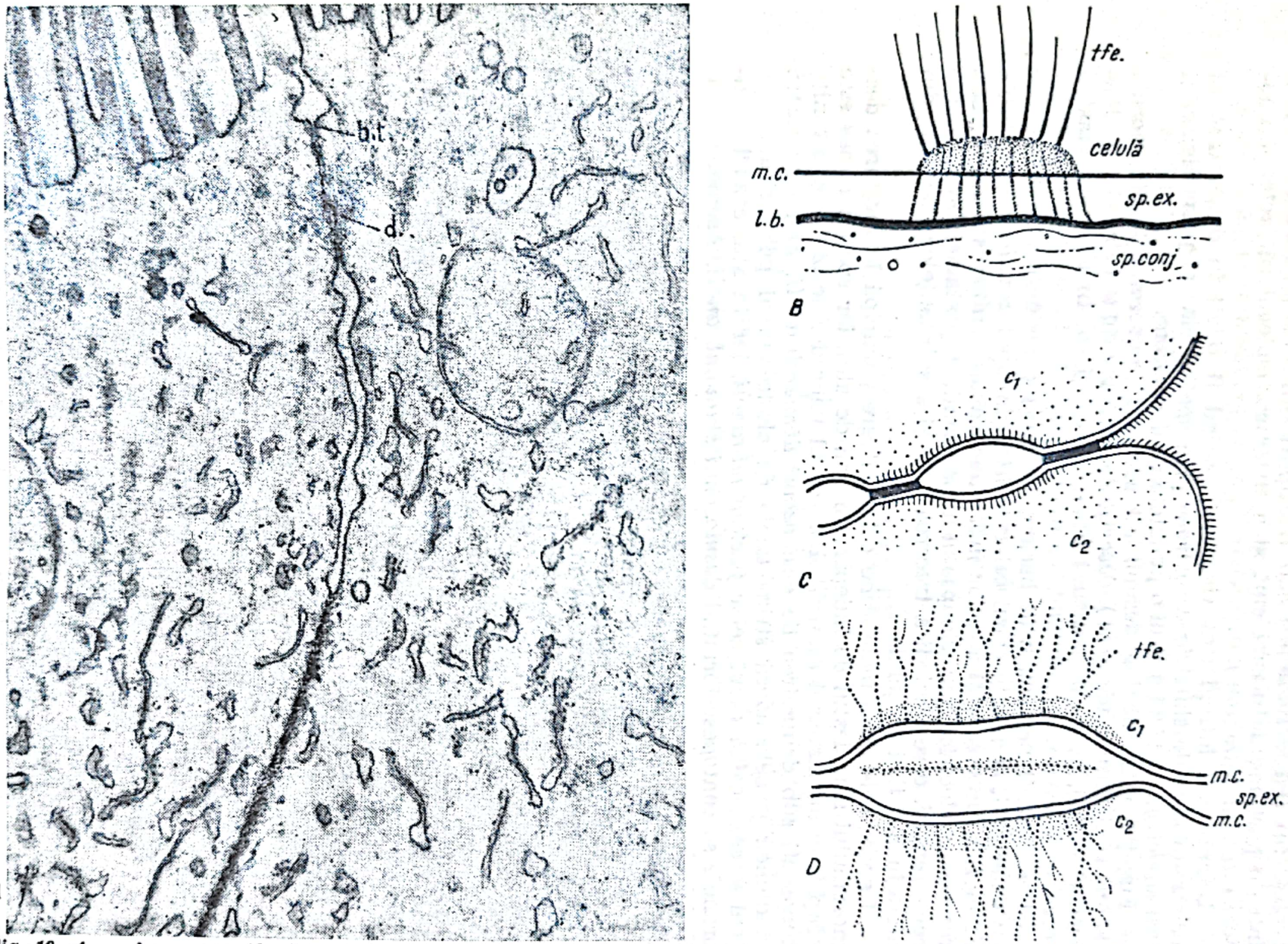


Fig. 19. A — desmozom (după M. Varo) ; *B* — semidesmozom ; *C* — homo-autodesmozom juxtalaminat ; *D* — nexus ; *m.c.* — plasmalemă ; c_1 și c_2 — citoplasmă ; *l.b.* — lamă bazală ; *sp. conj.* — spațiu conjunctiv ; *tfe.* — tonofilamente ; *sp.ex.* — spațiul extracelular ; *d.* — desmozom ; *b.t.* — bară terminală.

Scanned with OKEN Scanner

același tip *(ideodesmozomi)* sau de tipuri diferite *(allodesmozomi)* și între o porțiune de plasmalemă și o structură moleculară *(heterodesmozom* sau *hemidesmozom).*

Desmozomii întregi sînt *simetrici,* putînd fi tăiați în două jumătăți printr-un plan de simetrie care trece prin spațiul clar al plasmalemei și *asimetrici,* cînd există numai o jumătate de desmozom.

Funcțional, se disting desmozomi *aderenți* (reprezentați prin *macula adherens* și *zonula adherens),* descriși de M. Farguhar și G. Palade (1964), avînd o structură filamentoasă și rol în legarea strînsă a membranelor.

Desmozomii pot constitui bariere în calea difuziunii și schimburilor cu exteriorul, cum este cazul celor *închiși* (de tipul *zonula occludens),* a desmozomilor *septați* și ai celor *juxtamembranali.* Un caz special îl oferă rezistența electrică din sinapse a desmozomilor juxtamembranali și a celor septați, care împiedică trecerea apei și a substanțelor dizolvate din afară în spațiile intercelulare.

Uneori, cele două membrane celulare care participă la formarea desmozomului sînt destul de îndepărtate una de alta, iar spațiul rămas este ocupat de un material osmiofil. Este cazul unor desmozomi des întîlniți, cunoscuți sub denumirea de *desmozomi dismembranali.* Mai sînt cazuri cînd membranele aderă strîns unele de altele numai pe porțiuni mici (sau *nexus*), ca în cazul celor *juxtamembranali,* iar în alte cazuri membranele se contopesc formînd *desmozomii sinmembranali.* Asemenea contopiri ale celor două foițe externe ale plasmalemei pot să formeze septe (desmozomi) cînd membranele se unesc în multe porțiuni mici.

Contopirea membranelor poate lăsa spații mari de comunicare între celule, realizîndu-se un adevărat sincițiu datorită desmozomilor *sincițiali.* La desmozomii *juxtalaminari,* membranele celulare ale celor două celule adiacente sînt așezate paralele și alăturate, iar foița externă densă a fiecărei membrane lipsește în aria desmozomială, fiind înlocuită de două benzi solide mijlocii, alipite de parcă ar fi contopite. Bariera desmozomală poate separa complet citoplasma celor două celule creînd o rezistență electrică mare care nu permite cuplarea lor electrică. Este cazul desmozomilor *apocițiali.* În schimb, tipul desmozomial *haptocițial* dă posibilitatea, prin rezistența sa electrică scăzută, trecerii unui flux ionic între celule. Sinapsele electrice intră tocmai în această categorie.

Practic vorbind, rolul principal al desmozomilor este de a da celulelor o rezistență la tensiunile mecanice. Tripsinizarea și scoaterea Ca^{++} și Mg^{++} slăbesc legăturile intercelulare producînd disocierea țesuturilor. Această acțiune se datorește faptului că sînt atacate legăturile stabilite prin punți cu Ca^{++} sau prin amide și esteri la arginină și lizină. În cazul epidermei vertebratelor, la fiecare desmozom converg din citoplasmă tonofilamente de keratohialină, care întăresc coeziunea celor două jumătăți desmozomale și conferă epiteliului o mare rezistență la smulgere și la forțe de forfecare.

În cazul complexelor funcționale de la polul apical al enterocitelor, acestea formează adevărate *„chituri" hidraulice* care împiedică lichidul din lumenul intestinului să pătrundă printre celule, în afară.

Discurile intercalare ale miocardului sînt desmozomi cu rol de sinapsă de comunicare electrică, întrucît prin membrana lor se transmite impul-

Scanned with OKEN Scanner

sul cardiac de la celulă la celulă. Unele regiuni ale discurilor intercalare au filamente citoplasmatice care se ancorează la miofilamentele de actină ale benzii Z, prin acest dispozitiv transmiţîndu-se tensiunea de la o celulă la alta.

La plante sînt cunoscute de mult plasmodesmele care oferă o comunicare directă a celulelor între ele. La *Nitella* s-a constatat că rezistenţa electrică a acestor intercomunicări celulare este foarte scăzută, ceea ce denotă existenţa continuităţii de membrană în aceste punţi subţiri citoplasmatice. Şi la ouăle animalelor întîlnim astfel de comunicări celulare ; glicocalixul enorm al peştilor *(membrana radiata)* la începutul oogenezei este de natură glicoproteică, dar se îmbogăţeşte apoi în mucopolizaharide de tot felul. El este străbătut de microvili trimişi centrifug de oolemă şi centripet de celulele foliculare, ceea ce dă glicocalixului un aspect striat, de unde şi denumirea de „membrană radiată."

1.3. CONSTITUŢIA CHIMICĂ

Pentru a se putea studia compoziţia chimică a plasmalemei, ea trebuie izolată. În trecut se foloseau două metode, devenite clasice, de izolare : prin *şoc hipotonic,* cu care se hemolizau hematiile, obţinîndu-se „fantomele" eritrocitare şi prin *şoc hipertonic* (cu glicerol 50%, timp de o săptămînă) cu care se „jupuiau" amibele de plasmalemă.

Odată cu introducerea metodei de *ultracentrifugare diferenţială* în gradient de densitate a subfracţiilor celulare, a putut să se izoleze plasmalema şi la alte celule (fig. 20). Membranele obţinute sînt destul de contaminate dar pot fi identificabile prin antigene de suprafaţă şi prin ATP-aza sensibilă la oubaină. Astfel izolate, au o compoziţie globală de 40—70% proteine şi 30—60% lipide din greutatea lor uscată. Analiza amănunţită a plasmalemei hepatocitului de şoarece arată 47,5% proteine, 29% fosfolipide, 13,5% lipide neutre, 5,6% colesterol, 0,1% acid sialic, 3,3% acid ribonucleic şi 1% hexozamină. Spre deosebire de endomembranele celulare plasmalema are mai puţine fosfolipide, iar la celelalte animale conţine şi colesterol. El complexează cu fosfolipidele, contractînd filmul bimolecular membranos al lor. Printre fosfolipidele membranelor celulare citäm : lecitina, apoi fosfatidiletanolamina (din membrana bacteriană), fosfatidilcolina şi sfingomielina (care constituie 70% din lipidele totale şi reprezintă materialul de construcţie esenţial al membranelor), acidul fosfatidic, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol şi diglicerol, fosfatidilinozitol.

Din analizele făcute la diferite tipuri de membrană reiese că nu există o compoziţie tip pentru membranele diferitelor feluri de celule, deoarece atît cantitatea cît şi calitatea lipidelor variază de la ţesut la ţesut, în funcţie de specie etc. Este acum bine cunoscut faptul că acizii graşi polari ai membranelor variază după specia de organism analizată. De pildă, plasmalema eritrocitului are acizi graşi mononesaturaţi, în timp ce endomembranele care convertesc energia au acizi graşi polinesaturaţi.

Lucrările şcolii lui D. Green au arătat că în membranele celulare există proteine de structură care se deosebesc fundamental de proteinele cu activitate enzimatică. Astfel, compoziţia în aminoacizi a proteinelor

Scanned with OKEN Scanner

de structură este aceeaşi la toate membranele. Printre ele predomină glicocolul şi alanina, cu radicali apolari şi cu o înghemuire sterică slabă. Astfel de proteine, puţin încărcate, nu sînt solubile în apă, iar moleculele lor se reunesc uşor din cauza legăturilor de tip hidrofob care iau naştere între aminoacizii apolari ai diferitelor molecule. Ele complexează cu fosfolipidele prin legături necovalente — de tip hidrofob — stabilite între grupările apolare ale acizilor graşi şi aminoacizii apolari. În felul acesta iau naştere monomeri de proteine-fosfolipide care la *p*H-uri neutre, sub influenţa Mg^{++}, formează lanţuri de 35 Å Ø de polimeri. Dacă reziduurile apolare ale aminoacizilor stau pe feţele laterale ale monomerilor, iau naştere foiţe proteice, iar cînd lipidele maschează o parte din reziduurile polare de pe toată suprafaţa se nasc foiţe lipoproteice. Este caracteristică fixarea acestor proteine de structură de fosfolipide, după felul membranei celulare, astfel că ele formează mai mult de jumătate din cantitatea de

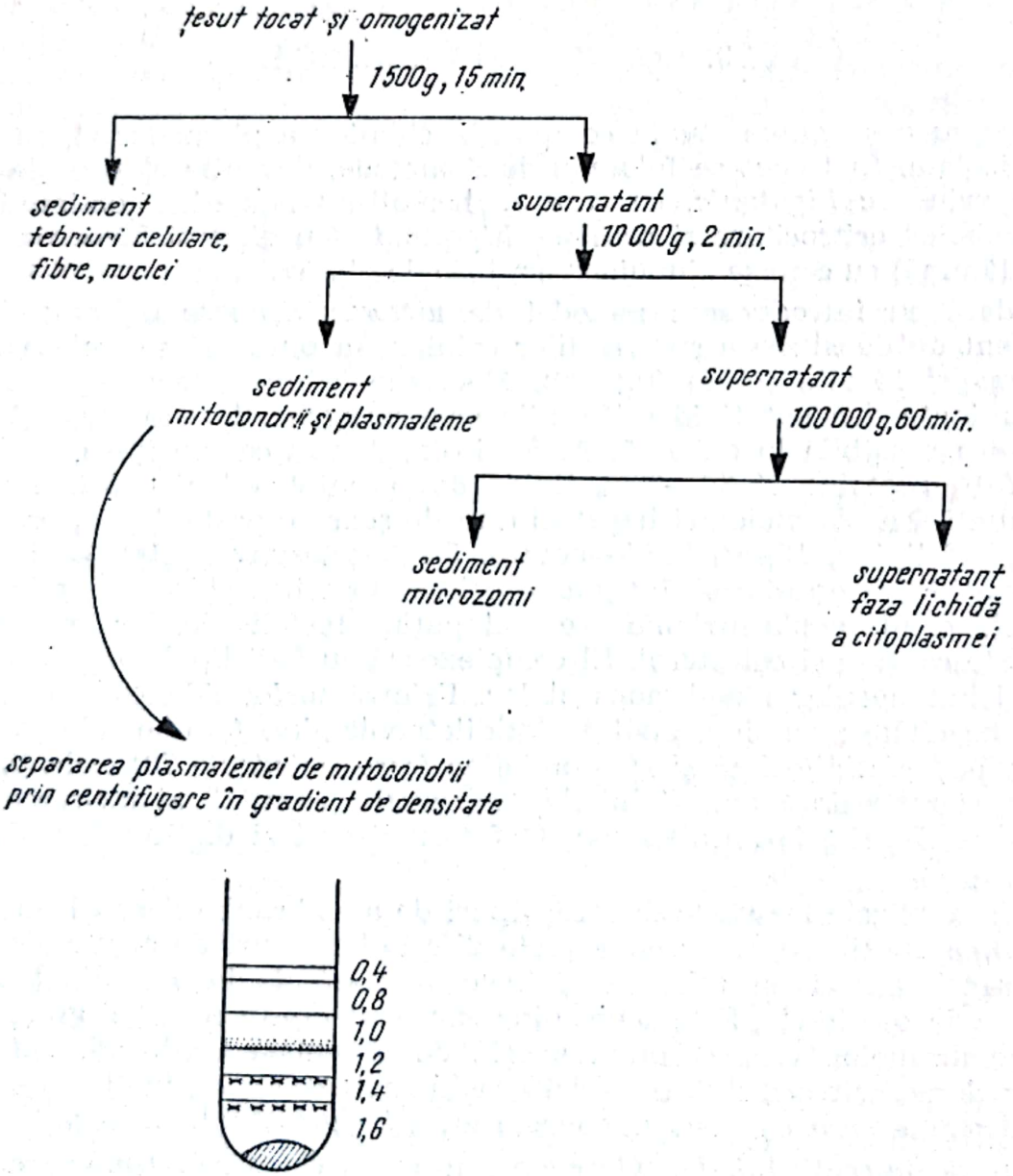


Fig. 20. Schema centrifugării diferenţiale a omogenatelor celulare, pentru a se obţine plasmaleme.

Scanned with OKEN Scanner

proteine membranare : cealaltă jumătate este reprezentată printr-o serie de enzime (ATP-ază, 5-nucleotidază, glicerofosfataze, acetilfosfatază, fosfodiesterază, glucozo-6-fosfatază, esteraze, trioso-3-fosfatdehidrogenază, $NADH_2$-citocrom-c-reductază, ADP-ază, IDP-ază, NAS-pirofosfatază etc.).

1.4. ROLURI ȘI ACTIVITĂȚI FIZIOLOGICE

Funcțiile membranei plasmatice sînt multiple, astfel :

— mișcarea și recombinarea suprafețelor celulare : *eccitoza* și *encitoza* (pinocitoză, fagocitoză) ;

— schimburile de substanțe cu mediul înconjurător și toate particularitățile celulare ale permeabilității ;

— suport al antigenelor de suprafață ;

— reglarea sau limitarea creșterii unui organ ;

— izolator electric în cazul tecii de mielină a celulelor Schwann ;

— generarea și conducerea influxului nervos, în cazul neuronului ;

— conversia energiei luminoase în impuls electric, în cazul membranei celulelor cu bastonașe din retină.

1.4.1. MIȘCAREA ȘI RECOMBINAREA SUPRAFEȚELOR CELULARE

Pe lîngă faptul că plasmalema izolează conținutul celular de mediul extern și, printr-o serie de formațiuni, leagă celulele între ele, ea este capabilă să „curgă", să se miște, să se contopească cu alte porțiuni de membrană, să se recombine și chiar să se schimbe cu o altă suprafață celulară. Dealtfel, și modelele experimentale cu monofilme de lipide polare, sau pur și simplu cu baloane de săpun, dovedesc că lichidele bidimensionale curg, se contopesc, se recombină etc., întocmai ca și plasmalema. Astfel, în eccitoză, întîlnim o destindere a membranelor, o contopire și o recombinare care, prin eliminarea conținutului veziculei din celulă, creează o mărire de suprafață (fig. 21). În cazul secreției granulelor de zimogen ale pancreasului exocrin studiat de P. Siekevitz și G. Palade (1960), s-a văzut cum plasmalema se contopește cu membrana veziculei de secreție. Această contopire se realizează prin influența pancreazyminei și, după cîtva timp, mai multe granule de zimogen își contopesc pereții, eliberîndu-se astfel tripsinogen, chimotripsinogen, amilază, lipază, nuclează, esterazele acumulate în ele (fig. 21). Un alt exemplu de recombinări ale suprafeței celulare îl constituie secreția de lipide și proteine din celulele glandei mamare. În cazul proteinelor (caseina etc.) ele se găsesc înconjurate de o membrană citoplasmatică, formînd mici vezicule care, cu timpul, se apropie de polul apical al celulei. Prin contopirea plasmalemei cu membrana veziculelor se formează caveole, iar proteinele ies din celulă. În cazul lipidelor, veziculele sînt mult mai mari și, de asemenea, înglobate într-o membrană. Ajungînd la suprafața celulei ele sînt incluse într-un scurt pseudopod care, cu timpul, se strangulează la bază, astfel că în lumenul glandei cad picături de lipide învelite de o dublă

Scanned with OKEN Scanner

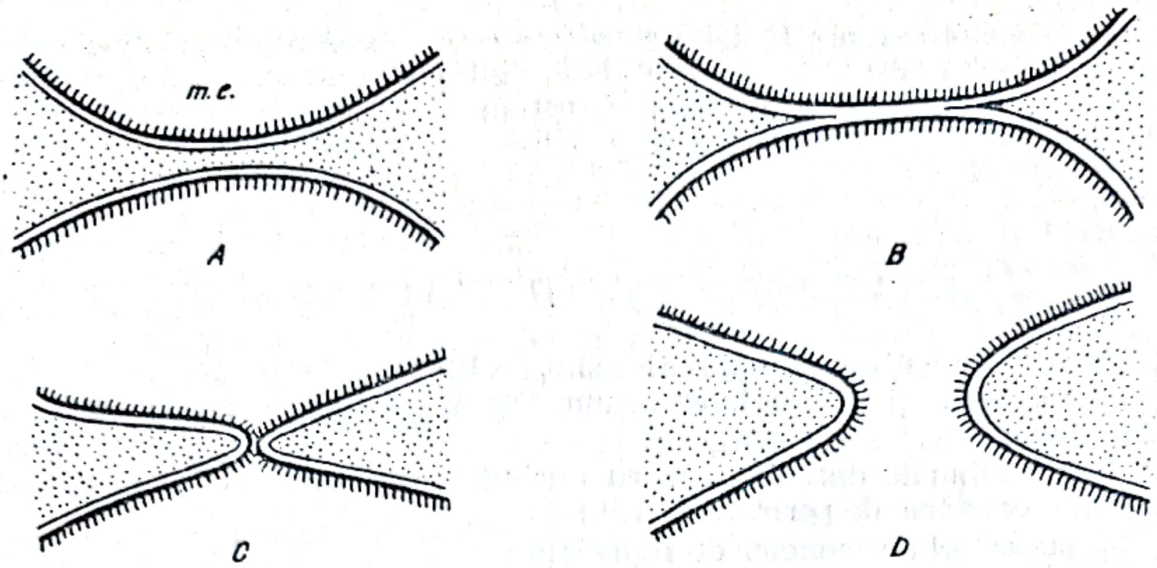


Fig. 21. A-D — aspectele contopirii şi recombinării membranelor în cazul eccitozei : c. — citoplasmă ; *m.e.* — mediul extracitoplasmatic.

membrană, şi anume, a plasmalemei la exterior şi membrana proprie la interior (fig. 22).

În cazul virusurilor ce produc tumori mamare, aceştia sînt înveliţi în membrane şi astfel sînt eliminaţi prin vîrful unor microvili. A. Berkaloff (1963) a descris modul prin care se elimină virusul Sendai din celulele alantoidiene ale embrionului de găină. Materialul viral se aglo-

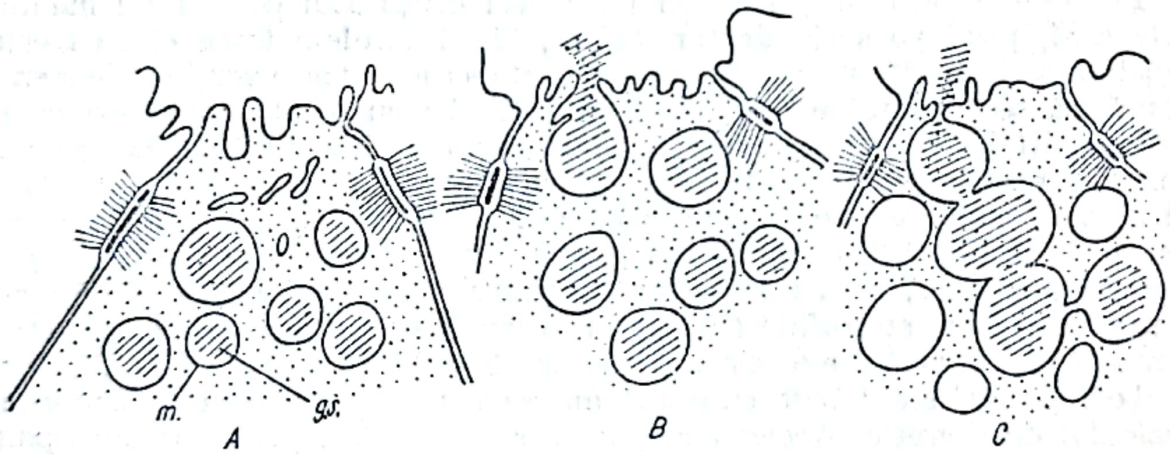


Fig. 22. Secreţia pancreasului exocrin ; *A* — polul apical al celulei pancreatice înainte de a fi stimulată să-şi verse produsul de secreţie ; *B* — imediat după stimularea excitaţiei cu pancreazimină ; *C* — în stadiul avansat al secreţiei : *m.* — membrana granulei de secreţie ; *g.s.* — granulă de secreţie cu tripsinogén, chemotripsinogen, amilază pancreatică, lipază, nucleaze.

merează sub forma unei benzi sub plasmalemă, după care foiţa internă a ei se îngroaşă şi glicocalixul de deasupra devine foarte înalt. Apoi membrana se evaginează sub forma unei vezicule care în final se rupe, astfel că materialul viral inclus în ea cade în lumenul glandular (fig. 23).

Mai sînt şi alte forme ale eccitozei printre care citäm : eliberarea nucleului din eritroblast în timpul formării eritrocitului ; eliminarea plache-

Scanned with OKEN Scanner

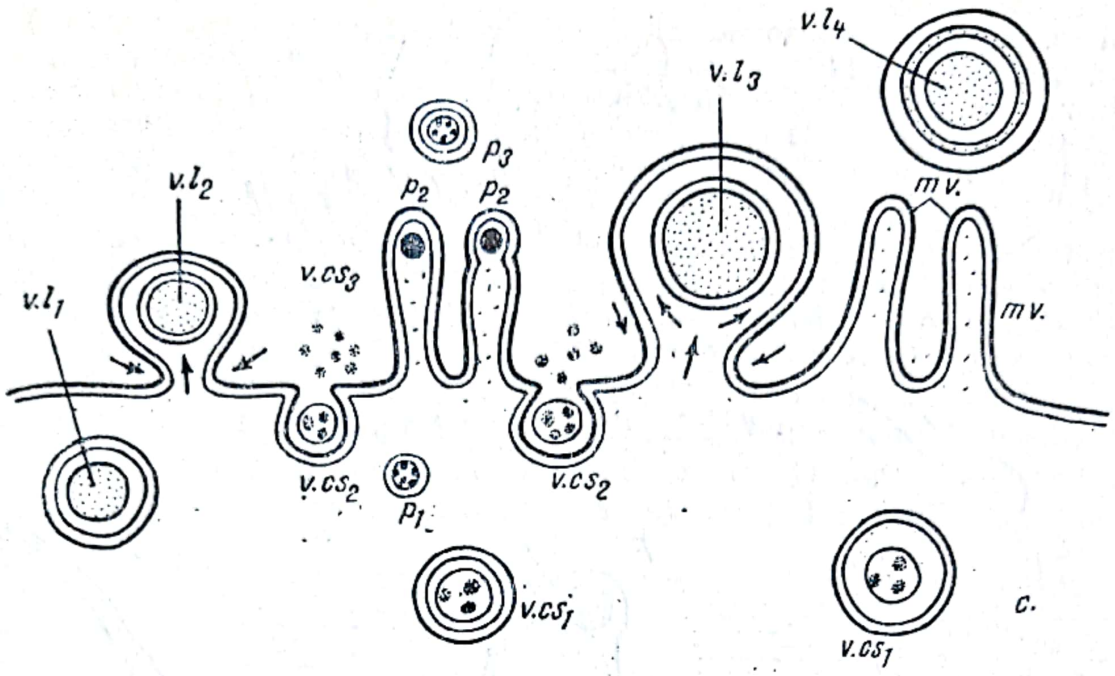


Fig. 23. Porțiunea apicală a unei celule din glanda mamară : *c.* — citoplasmă ; *v.l*$_1$-*v.l*$_4$ — vezicule lipidice învelite de membrana reticulului endoplasmic ; *p*$_1$-*p*$_3$ — particulele virale ale tumorii mamare ; *v.cs*$_1$-*v.cs*$_3$ — vezicule cu caseină ; *mv.* — microvili.
Se observă apropierea veziculei lipidice de plasmalemă, înglobarea ei în pseudopode, protrusia, separarea de pedicul de citoplasmă bazală, ca picătură înconjurată de microveziculă + un strat de citoplasmă (deci recombinări de membrană).
Veziculele cu proteine se apropie de suprafața membranei lor, se recombină cu a citoplasmei, se formează apoi caveole din care se eliberează proteinele. Particulele virale trec în vîrful microvililor, de unde se eliberează odată cu citoplasma prin constricția sa.

telor sanguine din megacariocit ; plasmodiereza diviziunii celulare ; eliberarea granulelor de neurosecreție din sinapsele terminațiilor nervoase.

În sfîrșit, un caz deosebit prin complexitatea sa îl reprezintă fecundația la *Hydroides* și *Saccoglossus* studiată de L și A. Calwin (1963). Cercetările lor de microscopie electronică au arătat că acrozomul veziculelor de la *Hydroides* are o granulă centrală și granulații fine sub membrana acrozomală, iar între acrozom și membrana nucleului se mai găsește un material periacrozomal care trimite digitații în veziculă. La vîrful acrozomului se mai află o mică veziculă a cărei ruptură coincide cu activarea spermatozoidului. Vezicula intră mai întîi în contact cu învelișul mucogelatinos al oului și capul spermatozoidului se deschide la nivelul veziculei apicale. Or, în acest moment, membrana veziculei acrozomale se unește cu membrana citoplasmatică a spermatozoidului. Granula acrozomală se dizolvă, iar digitațiile pătrund din ce în ce mai adînc în învelișul mucogelatinos sub forma unor tubuli cu material periacrozomal care sfîrșesc prin a atinge oolema. La primul contact al spermatozoidului cu membrana oului se formează conul de fecundație care înglobează digitațiile periacrozomale, le lizează, iar membrana oului se contopește cu membrana spermatozoidului înglobîndu-se, astfel, pronucleul acestuia în citoplasma oului (fig. 24).

Scanned with OKEN Scanner

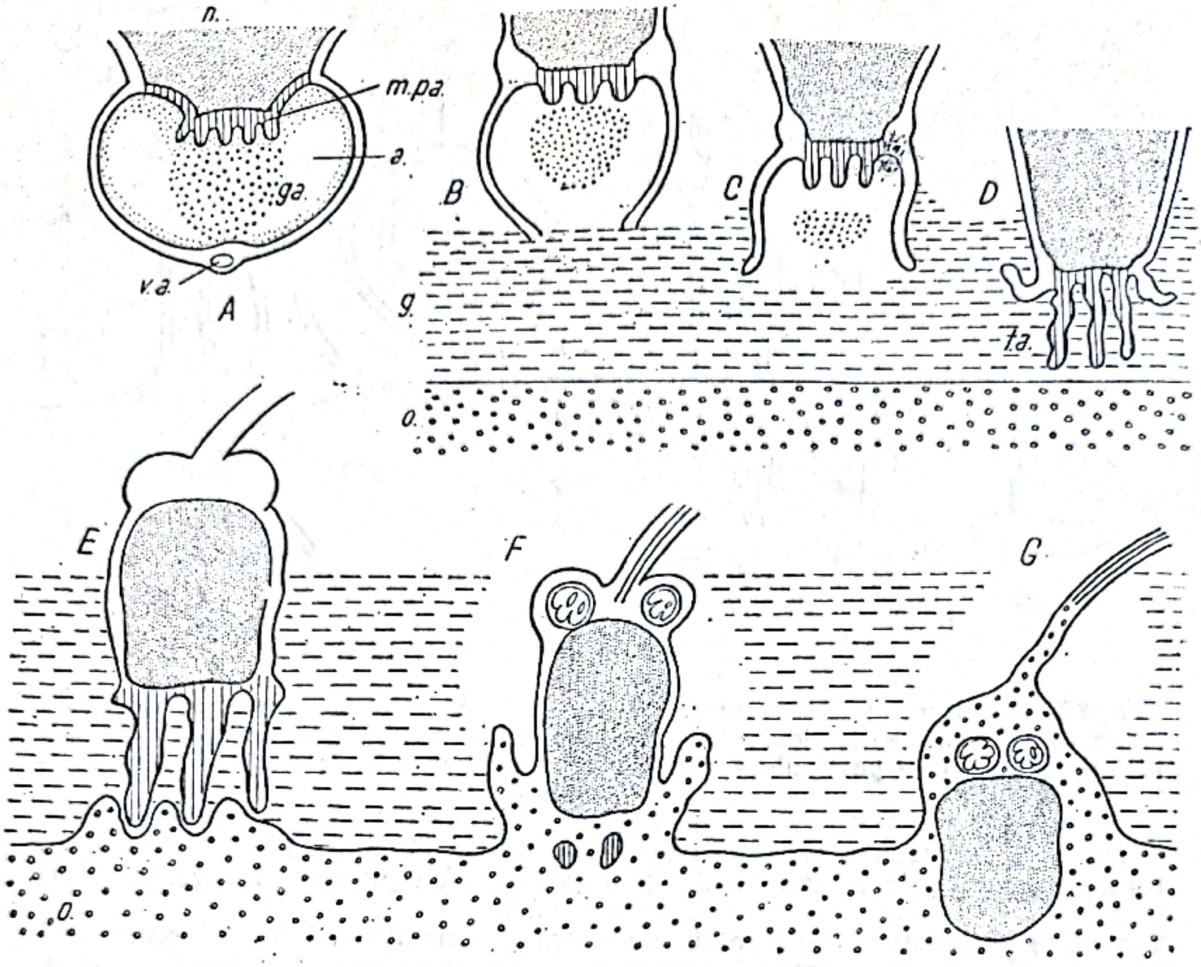


Fig. 24. A — acrozomul din capul spermatozoidului de *Hydroides*: *n.* — nucleu; *a.* — acrozom; *g.a.* — granulă acrozomică; *m.pa.* — material periacrozomal; *v.a.* — veziculă acrozomică; *B* — contactul cu ganga (*g*) și ruperea veziculei acrozomale; *C* — ruperea veziculei acrozomale și liza ganghei oului; *D* — tubii acrozomali (*t.a.*) ai materialului periacrozomal traversează ganga; *E* — contactul gameților cînd tubii ajung pe oolemă (*o*); *F* — ridicarea conului de fecundație și dispariția membranei; *G* — pătrunderea spermatozoidului în con și fuziunea membranelor (din C a l w i n).

1.4.2. ENDOCITOZA

Endocitoza este un mecanism fiziologic tradus morfologic prin deplasarea membranei celulare în interior. Se formează astfel vacuole cu pereți ce provin din plasmalemă și în care sînt înglobate particule din afară. Aceste vacuole sau *endozomi* permit trecerea particulelor și ionilor care nu pot străbate plasmalema, includ în celulă substanțe care au reacționat specific cu membrana și pe care aceasta le absoarbe selectiv, dar și protejează celula de pătrunderea unor cantități prea mari de substanțe. Foarte ușor se poate urmări acest proces în contrast de fază la formele amiboidale de celule care includ fie particule figurate, fie marcajul mediului exterior dat de coloranți vitali, substanțe fluorescente, albastru alcian, „fantome" eritrocitare, bacterii, latex, granule de melanină etc.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a putea aprecia capacitatea de endocitoză a unei celule se iau în considerație următoarele criterii stabilite de H. Sitte: procesul să fie reproductibil în mod statistic; intervalul de timp dintre imaginile luate individual să fie exact determinabile ca durată și să corespundă la viteza mișcării întregului proces; diferențierea dintre imaginile individuale să fie clară, așa fel ca direcția mișcării să apară pregnantă.

Pentru urmărirea procesului se folosesc substanțe marcate de diferite dimensiuni, care se adaugă în mediul de cultură. Astfel de particule sînt: unele grosiere (latex, sulfat de mercur, aur coloidal), altele mai fine (miofer, ferlecit, feritină, glicogen) și, în fine, soluții electronoptice amorfe (albuș de ou, albastru alcian) care induc endocitoza și inhibă mișcarea celulei amiboidale. Procesul poate fi provocat și experimental cu ajutorul a mai multor factori inductori. Tabelul de mai jos arată concentrația optimă și *p*H-ul la care o serie de substanțe pot provoca endocitoza (tab. 1).

Tabelul 1

Factorii inductori ai endocitozei

Subiecte inductoare	*p*H optim	Concentrația
Cloruri, sulfați și azotați de Na, K, Mg etc.	7	0,1—0,15 M.
Aminoacizi	8—10	0,063 M
Proteine	4	globulină 0,0001 M hemocianină 0,0001 M ribonuclează 0,0001 M albuș de ou 0,5% M
Albastru alcian tionină acriflavină	4—10	0,1—0,01%
Fier	4—6	feritină miofer R 5%, ferlecit 0,6%
Tampon fosfat și maleat	6—8	0,01—0,05 M

Observarea endocitozei induse se face la microscopul cu contrast de fază. De exemplu, sub influența unei substanțe inductoare, o amibă devine discoidală din alungită cum era. La periferia sa apare o citoplasmă hialină cu încrețituri, apoi o serie de pseudopode care au la capetele lor mici invaginări. Acestea se adîncesc, formînd canalicule endocitare, iar pseudopodul se lărgește (fig. 25). La baza canaliculelor se formează o vacuolă mare cu produsul din mediu. Canaliculul este de regulă tubular, dar uneori poate fi și sub formă de butelie. Ele sînt lungi de 30—80 μ și se pot divide datorită alungirii pseudopodului.

Studiile de microscopie electronică au stabilit că prima fază a inducției endocitozei este adsorbția substanței inductoare pe glicocalixul mucoid

Scanned with OKEN Scanner

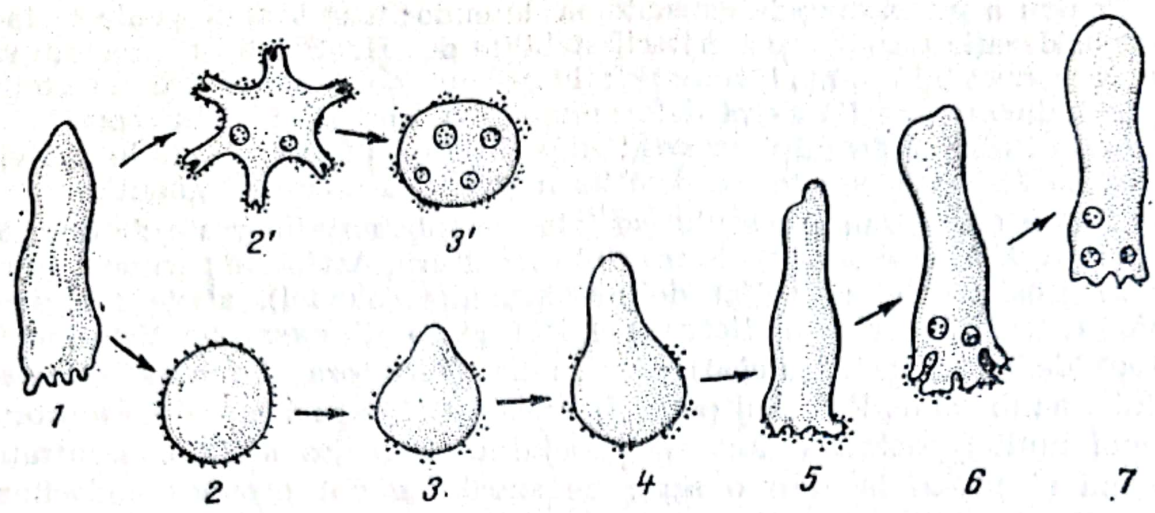


Fig. 25. Comportamentul suprafeței celulare de la *Amoeba proteus* în timpul endocitozei permanente (*1-7*) și induse (*1-2'-3'*) (după W. Stockem): *1-5* — în decurs de 4 minute particulele endocitale sînt concentrate în proporție de 0,5% în uroid; *6* — endocitarea lor în citoplasmă; *7* — eliberarea restului de particule prin desprinderea de pe uroid; *2, 3* — la o mare concentrație de particule amiba se rotunjește și ele se lipesc pe suprafața protozoarului; *4* — apoi se formează uroidul; *2'* — adăugîndu-se substanțe inductoare odată cu particulele se formează pseudopozi cu canale de endocitare.

de la suprafața celulei. Această adsorbție produce endocitoză numai dacă este cantitativă, mai mult chiar ea distruge stratul mucoid. În a doua fază are loc formarea endosomului, care este determinată de energia ATP furnizată plasmafilamentelor contractile ale hialoplasmei. Mai întîi ia naștere un canal scurt, înconjurat de plasmafilamente, după care ele se aglomerează la baza canalului alungindu-l datorită contractării lor și, în final, plasmafilamentele se așază în straturi paralele între ele și în sensul alungirii canalului.

Procesul endocitozei se poate aprecia cantitativ prin folosirea concomitentă atît a substanțelor inductoare cît și a unor substanțe marcate care sînt încorporate în cadrul metabolismului celular. Astfel, suprafața amibelor crește cu 50% în timpul endocitozei, iar în prima fază a inducției, care durează 20 de minute, volumul ingerat este de 5—10% din volumul celular, iar celula crește în greutate uscată cu 0,5—1% (tab. 2).

Un al doilea ciclu de endocitare poate reîncepe numai după ce o amibă, care a fost supusă unei inducții endocitare, este ținută patru ore într-un mediu normal și după aceea repusă iar în medii cu inductori endocitari. Se pare însă că membrana ei s-a consumat în decursul primului ciclu, deoarece la al doilea ingerează mai puțin.

Paralel cu aceste cercetări experimentale, endocitoza de la amibe a fost studiată în condițiile lor normale de viață, într-un mediu fără inductori. K. Wohlfarth-Bottermann a urmărit la microscopul interferențial cu contrast de fază stadiile endocitozei permanente la care constată că uroidul nu are un rol preponderent în adsorbția ci în transportul substanțelor trasoare.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Modificări cantitative în endocitoză

Obiectul testat	Durata experienței (min.)	Substanța inductoare	Substanța marcată	Creșterea în volum față de volumul inițial (%)	Creșterea în masă uscată (%)
Chaos chaos	180	γgamaglobulină	fluoresceină	30—40	5
Chaos chaos	20	albumină bovină	^{14}C-glucoză	1—10	0,8
Chaos chaos	20	NaCl	^{22}Na	1—9	0,5
Amoeba proteus	20	albumină bovină	^{131}I-albumină	23—200	7,5—66
Macrofage	60	albastru alcian	^{14}C-glucoză	30	—
Histiocite	60	albastru alcian	^{14}C-glucoză	30	—

Lucrările de microscopie au precizat că uroidul are pe suprafața plasmalemei sale un strat mucoid — glicocalixul antenular — iar imediat sub membrana celulară o ectoplasmă fără incluziuni, cu structură membranoasă. Sub aceasta se găsește endoplasma cu mitocondrii, dictiozomi și vacuole endocitare. Cînd suprafața uroidului este netedă, suprafața prin care înglobează reprezintă 1% din suprafața totală a celulei, în timp de 30 minute, iar cînd este încrețită 10% (fig. 26). Raportul $\frac{\text{ectoplasmă}}{\text{endoplasmă}}$ se modifică în favoarea ectoplasmei, cînd endocitoza este maximă, și invers. În faza contractilă a uroidului, cînd se formează canaliculele endocitare, apar și plasmafilamente în jurul canaliculelor. Acestea contribuie, ca și în cazul endocitozei induse, la alungirea endozomilor.

Studiindu-se formarea endozomilor la *Amoeba proteus,* în cazul transportului albușului de ou s-a constatat mai întîi alipirea particulelor de albuș de glicocalixul mucos, apoi formarea unui canalicul care se dilată la bază (fig. 27, *1*) și din el se desprind endozomi primari (fig. 27, *2*). La început ei au stratul mucos pe partea internă a membranei, împreună cu particulele endocitate alipite de el (fig. 27, *2*), iar după cîtva timp glicocalixul se desprinde, ca și particulele care umplu conținutul veziculei (fig. 27, *3*). Scurt timp apoi endozomii se fragmentează în veziculițe (fig. 27, *4* și *5*), care se încarcă cu hidrolaze acide provenite din dictiozomi (fig. 27, *9*) și se contopesc cu alți endozomi mai vechi constituind formațiuni lizozomale (fig. 27, *8*).

În concluzie, transportul prin veziculele celulare membranare constă din trei procese : *endocitoza,* prin care se introduc în celule substanțe și particule de diferite mărimi cu ajutorul invaginărilor plasmalemei ; *intracitoza,* adică desprinderea de vezicule transportoare din dictiozomi, fragmentări de endozomi primari, asamblări de endozomi primari în formațiuni secundare, lizozomale ; *exocitoza,* adică eliminarea prin recombinări și contopiri de membrană a unor produse celulare.

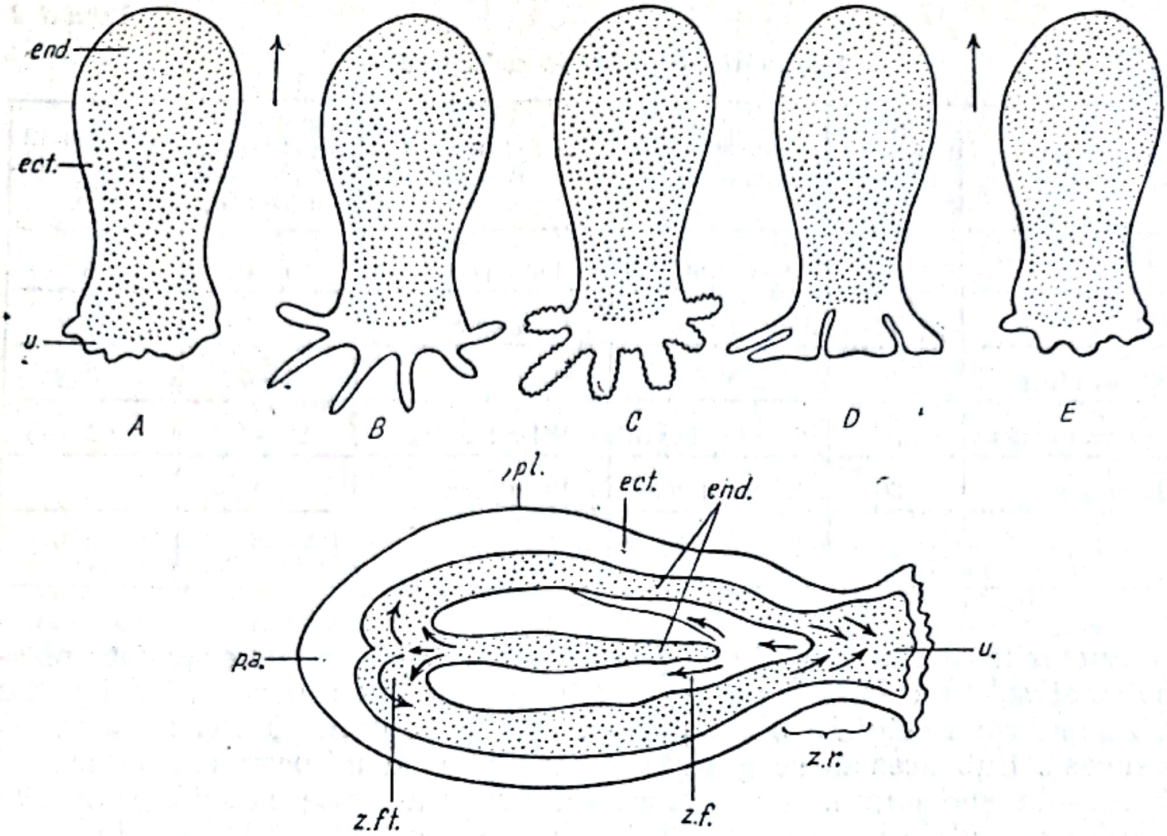


Fig. 26. A-E — modificările uroidului de la *Amoeba proteus* în timpul locomoției (*sus*) și organizarea generală a amibei (*jos*) :
p.a. — pseudopod anterior ; *z.ft.* — zonă în fîntînă ; *ect.* — ectoplasmă ; *pl.* — plasmagel ; *end.* — endoplasmă ; *u.* — uroid ; *z.f.* — zonă în foarfece ; *z.r.* — zonă de refacere (după W o h l f a r t h-B o t t e r m a n n).

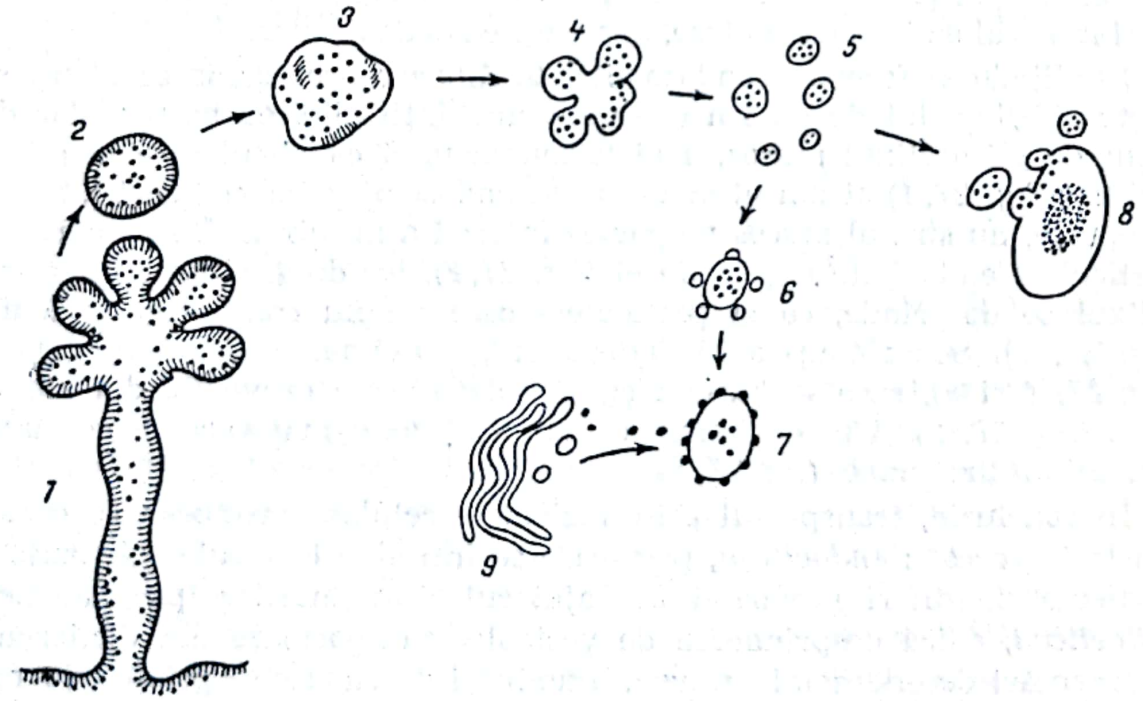


Fig. 27. 1-9 — diferite stadii în formarea endozomilor în cursul înglobării albușului de ou, la *Amoeba proteus* (modificat, după W. S t o c k e m).

Scanned with OKEN Scanner

Prima fază a endocitozei este adsorbţia ionilor, particulelor şi moleculelor de stratul mucoid al glicocalixului. Ceea ce este important în acest aspect al endocitozei este concentrarea selectivă a materialului în cursul ingestiei şi deteriorarea stratului mucoid. Deci, accentul cade nu pe adsorbţia materialului ci pe cantitatea sa prinsă de glicocalix. A doua fază a endocitozei este formarea endozomilor din plasmalemă şi transformarea lor în lizozomi prin aportul celular de hidrolaze acide.

1.4.3. SCHIMBURILE PRIN MEMBRANA

Celulele iau din mediu tot felul de substanţe indispensabile menţinerii activităţii lor fiziologice şi elimină produse elaborate şi de excreţie. În felul acesta are loc un schimb permanent între celule şi mediul exterior, datorită faptului că membrana celulară este *permeabilă,* fiind traversată de multe substanţe dizolvate. Dar permeabilitatea este *selectivă* în sensul că nu toate tipurile de substanţe pot străbate bariera membranei celulare. Selectivitatea este în funcţie şi de alţi parametri, ca : tipul de celulă, *p*H, *r*H-ul mediului, timpul, solubilitatea şi concentraţia substanţei dizolvate etc. Nefrocitele, de pildă, reabsorb glucoza în mod normal dar în diabetul florizintic α-galactoza este oprită de epiteliul glomerular în timp ce ß — galactoza îl străbate.

În celulă se găsesc proteine nedifuzibile încărcate negativ (anioni), alături, bineînţeles, de anioni şi cationi difuzibili care se găsesc atît înăuntru cît şi în afara celulei. Prezenţa particulelor nedifuzibile încărcate negativ (*R*) determină o repartiţie inegală a ionilor difuzibili, care duce la o anumită *stare de echilibrare :*

$$\frac{[NO_3^-]\ \text{int.}}{[NO_3^-]\ \text{ext.}} = \frac{[Cl^-]\ \text{int.}}{[Cl^-]\ \text{ext.}} = \frac{[Na^+]\ \text{ext.}}{[Na^+]\ \text{int.}} = \frac{[K^+]\ \text{ext.}}{[K^+]\ \text{int.}} = r,$$

valoarea *r* depinzînd de concentraţia ionilor nedifuzabili ; şi cum :

$$[Cl^-]\ \text{int.} < [Cl^-]\ \text{ext.}\ ;\ [Na^+]\ \text{int.} < [Na^+]\ \text{ext.},$$

există o diferenţă de concentraţie pentru ionii difuzibili. Pentru a se compensa această diferenţă, ia naştere o *diferenţă de potenţial* pe cele două feţe, internă şi externă, a membranei. Ea este calculată prin formula :

$$V_{\text{ext.}} - V_{\text{int.}} = E = \frac{RT}{ZF} \log. \frac{[C\text{int.}]}{[C\text{ext.}]},$$

în care potenţialul celor două feţe este notat cu *V* ; *R* este constanta molară a gazelor perfecte ; *T* — temperatura absolută ; *F* — electronulgram sau faraday, $C_{\text{int.}}$ şi $C_{\text{ext.}}$ — concentraţiile de substanţă dizolvată, ionizabilă.

Asemenea *echilibru energetic* al unui ion de valenţă *Z* este exprimat sub forma egalităţii dintre raportul concentraţiilor sale la interior şi la exterior şi diferenţa de potenţial a membranei. Printr-un travaliu osmotic

Scanned with OKEN Scanner

este transportat un ion-gram din afară înăuntru sau invers, de valoarea $RT \log. \frac{C_{int.}}{C_{ext.}}$ și se înregistrează un travaliu electric corespunzător : $ZF\ (V_{int.} - V_{ext.})$. Bilanțul energetic este nul cînd travaliul osmotic W este egal cu travaliu electric $ZF\ (V_{int.} - V_{ext.})$, în care F este 96 520 coulombi per mol de încărcătură, iar $V_{int.} - V_{ext.}$ este valoarea potențialului transmembranar în jouli per coulombi sau E. Diferența de potențial a membranei este aceeași pentru toți ionii difuzibili și, de aceea, raportul concentrațiilor fiecăruia dintre ei este conform cu ecuația : $E = \frac{RT}{ZF} \log. \frac{C_{int.}}{C_{ext.}}$ și, în cazul concret al Cl^- unde $Z = -1$ și al K^+ unde $Z = +1$,

$$E = \frac{RT}{-F} \log. \frac{(Cl^-)\ \text{int.}}{(Cl^-)\ \text{ext.}} = \frac{RT}{F} \log. \frac{(Na^+)\ \text{int.}}{(Na^+)\ \text{ext.}},$$

această relație exprimînd *echilibrul cinetic* prin care fiecare ion prezintă fluxuri egale în ambele sensuri. Fluxul se măsoară prin numărul de ioni care traversează într-o secundă un cm^2 de membrană. Relația stabilită este aceea în care $flux_{int. \to ext.} = flux_{ext. \to int.}$, care indică tocmai compensarea precisă și stabilă a concentrațiilor.

Atunci cînd se aplică pe o anumită porțiune a membranei o diferență de potențial E' diferită de E, care reprezintă diferența de potențial a echilibrului energetic, se rupe echilibrul și apare o migrație de ioni între cele două compartimente așa încît fluxurile din cele două sensuri nu mai sînt egale : $f_{int. \to ext.} \neq f_{ext. \to int.}$ și dau un flux rezultant : $f_r = f_{int. \to ext.} - f_{ext. \to int.}$ Corelînd cu cantitățile, obținem relația :

$$\frac{f_{int. \to ext.}}{f_{ext. \to int.}} = \frac{C_{int.}}{C_{ext.}} \cdot e^{-\frac{ZFE}{RT}}.$$

Asemenea fluxuri se datoresc forțelor de difuzie și celor electrice, care vor acționa pînă la atingerea unui echilibru în care concentrațiile compensează diferența de potențial. Realizarea acestei compensații se face printr-un *transport pasiv*. Membrana funcționează ca o „sită" care lasă să treacă unii ioni și pe alții îi oprește. Însă în celula vie formula de mai sus nu se verifică întotdeauna. Membranele acționează prin procese exoenergetice proprii transportului unui fel de ioni, într-o anumită direcție, contra gradientului de concentrație. Membrana este aceea care transportă ionii respectivi *în mod activ*.

Astfel, toate celulele sînt capabile de un *transport activ homocelular*. Ele pot acumula substanțe din mediul extern, după cum pot elimina alte substanțe. În primul caz se realizează o creștere a concentrației intracelulare, iar în al doilea o scădere a concentrației față de mediul exterior. Hematia, de pildă, are o membrană destul de permeabilă pentru Na^+, K^+ și H_2O. Întrebuințînd ^{24}Na, ^{42}K și H_2O se constată că K^+ este aspirat activ în interior, în timp ce Na^+ este eliminat în afară. În același timp, amîndoi cationii au tendința să revină, K^+ în afară și Na^+ înăuntru, datorită permeabilității membranei, dar transportul activ menține astfel un echilibru staționar, încît concentrația K^+ în hematie este de 150 mEq față de plasmă, unde sînt numai 5 mEq, iar Na^+ la exterior este în concentrație

Scanned with OKEN Scanner

de 144 mEq şi în interior de 12,2 mEq. Energia necesară transportului activ prin membrana hematiei este dată de ATP-ul rezultat prin conversiunea glicolitică a glucozei în două molecule de lactat. Dacă se tratează hematiile cu fluorură de sodiu (inhibitor al enolazei glicolitice) atunci concentraţiile de Na^+ şi K^+ din hematii se egalizează cu cele din plasmă. În celulele eucariote transportul activ este asigurat de ATP din fosforilarea oxidativă mitocondrială, deoarece decuplarea acesteia cu 2,4—dinitrofenol inhibă transportul activ. La fel sînt transportaţi în interiorul unor celule aminoacizii şi glucoza, iar H^+ este scos în afară.

Datorită acestor transporturi active homocelulare se pot menţine *p*H-ul şi compoziţia ionică intracelulare constante, asigurîndu-se o activitate optimă a tuturor enzimelor endocelulare. Celulele unor drojdii pot trăi foarte bine în medii nutritive în care au loc variaţii mari de *p*H, Na^+ şi K^+, păstrîndu-şi concentraţia hialoplasmatică tocmai datorită vitezelor diferite cu care membrana pompează necesarul de materiale. Reglarea vitezei de pompare se face, probabil, datorită unor detectori membranari prin care membrana „apreciază" concentraţiile în interior şi la exterior. Dacă ne gîndim că numeroase celule pompează înăuntru glucoză şi aminoacizi, atunci înţelegem că prin acest fenomen ele asigură aprovizionarea cu „combustibili", după cum, invers, eliminarea unor produşi realizează o „curăţire" neîncetată a hialoplasmei.

O altă formă de transport activ este acela *transcelular,* de la organismele superioare. De pildă, conţinutul gastric are o concentraţie în ioni de H^+ de 0,1 M în timp ce plasma sanguină, pe seama căreia se formează, este abia de $2,5 \times 10^{-8}$M. Deci ionii de H^+ se găsesc în sucul gastric într-o concentraţie de 10^6 ori mai mare ca în plasma sanguină de unde provin. Ori celulele parietale ale glandelor fundice pompează afară H^+, prin platoul lor invaginat şi cu microvili, astfel că în 24 ore se formează 2,5 litri de HCl de 0,16 M. cu $pH = 1$. În acelaşi timp, celulele parietale elimină în plasma sanguină Na^+ şi reţin atît din plasmă cît şi din sucul gastric K^+. Aceste celule au, deci, o polarizare direcţională diferită a pompelor asigurînd o concentrare a K^+ atît prin polul apical cît şi prin cel bazal, o eliminare a Na^+ în plasmă prin polul bazal şi a H^+ prin cel apical.

Bineînţeles că transportul activ se realizează şi în cadrul sistemului de membrane endocelulare, fiind cunoscut cazul membranelor mitrocondriale care acumulează Ca^{++}, Ba^{++}, Mg^{++}, HPO_4^{--} şi elimină H^+. Prin transportul activ intracelular se pot acumula în mitocondriile oocitelor anumite cantităţi de molecule mari proteice care, cu timpul, transformă mitocondria într-o granulă de vitelus.

S-a calculat creşterea energiei libere necesară transportului unui iongram de H^+ din hialoplasma celulei parietale a glandei fundice, unde concentraţia H^+ este de 1×10^{-7}M şi travaliul executat în elaborarea unui suc gastric de 0,1 M pe seama plasmei sanguine la 20°C, astfel:

$$\Delta G^\circ = 2,3 \times 1,98 \times 293 \log. 10 \frac{10^{-1}}{10^{-7}} = 2,3 \times 1,98 \times 293 \times 6 = 8000 \text{ cal/mol.}$$

Deci trebuie o energie de 8000 cal. care să permită trecerea a 1 iongram de H^+ din plasmă în cavitatea gastrică, cam atît cît este necesar hidrolizei unui mol de ATP în ADP. Histochimic, se poate evidenţia şi

Scanned with OKEN Scanner

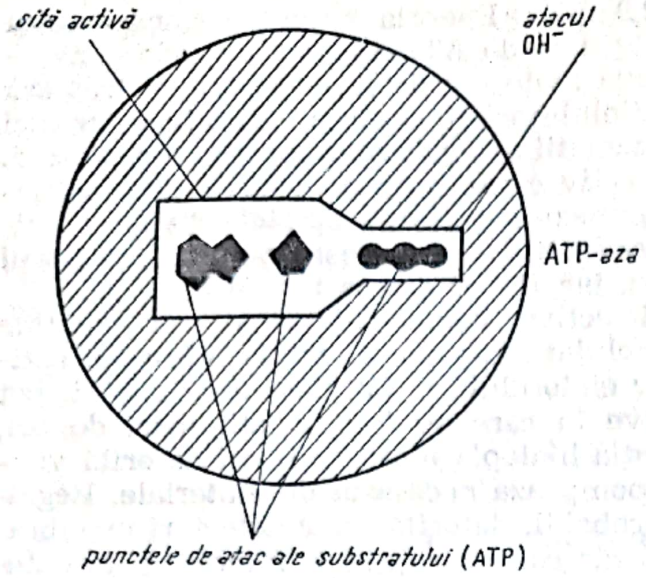


Fig. 28. Asimetria sitei active. Molecula de ATP nu se poate adapta decît într-un fel la cele trei puncte de atac complementare. Ionul OH— de atac trebuie să abordeze complexul enzimă-substrat la punctul indicat (după A. Lehninger).

ATP-ază în membrana celulară, astfel că la prima vedere putem spune că o oarecare cantitate de energie dată de ATP este utilizată în travaliul osmotic prin care se deplasează substanţe solvite, opus gradientului de concentraţie. Transportul într-o anumită direcţie a unei molecule este realizat deci de enzime membranare.

Enzimele, după cum se ştie, sînt specifice pentru un anumit substrat, viteza catalizei fiind determinată de concentraţia substratului. Activitatea enzimatică are o acţiune direcţională şi poate fi inhibată cu agenţi chimici specifici.

Această acţiune direcţionată se poate ilustra prin exemplul ATP—ATP-ază. ATP se inseră în „situsul" activ al ATP-azei, şi anume, la cele trei „puncte de ataş" complementare : unul pentru adenină, altul pentru riboză şi al treilea pentru grupările fosforice terminale (fig. 28). Acţiunea OH^- are loc în dreptul legăturii dintre fosfatul 2 şi 3, astfel că atunci cînd substratul se separă în ADP şi P ~, fiecare din componente se îndepărtează difuzînd dintr-un punct specific al situsului activ. Deci situsul este asimetric, şi atunci cînd enzima face parte din proteinele membranare se orientează în raport cu planul membranei. Datorită situsului activ, enzima acceptă ATP numai pe o parte a membranei, şi anume pe faţa sa internă (fig. 29). Astfel plasat, ATP este hidrolizat prin folosirea anionului OH^{--}, care atacă grupul terminal P şi provoacă clivarea ATP în ADP şi HPO_4^{--}, care părăsesc situsul : ADP şi HPO_4^{--} trec în interior, pe partea unde a pătruns ATP, iar la exterior, prin pierderea OH^-, mediul va rămîne bogat în H^+, deci va deveni mai acid.

Cercetările de histoenzimologie electronmicroscopică, precum şi acelea de citofiziologie au arătat prezenţa ATP-azei sensibile la Na^+ şi K^+ în membrana celulară. Ea se localizează, aşa cum s-a mai spus, pe faţa internă a membranei celulare. Pe această faţă există un strat proteic sub forma unui singur lanţ ordonat şi polarizat, ce poartă pe el grupări anionice şi cationice orientate, iar printre acestea se află centre active ATP-azice. Atunci cînd la majoritatea grupărilor anionice sînt asociate perechi de ioni de Na^+ şi K^+ se poate manifesta pompa de Na^+. Prin pomparea neîncetată a Na^+ în afară, celula nu are decît 35 mEq/l Na^+, faţă de cei 147 mEq din mediul extracelular. În aceste condiţii însă, pe faţa internă a plasmalemei are loc o nouă distribuţie a densităţii electronice tocmai datorită perechilor de ioni de Na^+. Această arhitectonică

Scanned with OKEN Scanner

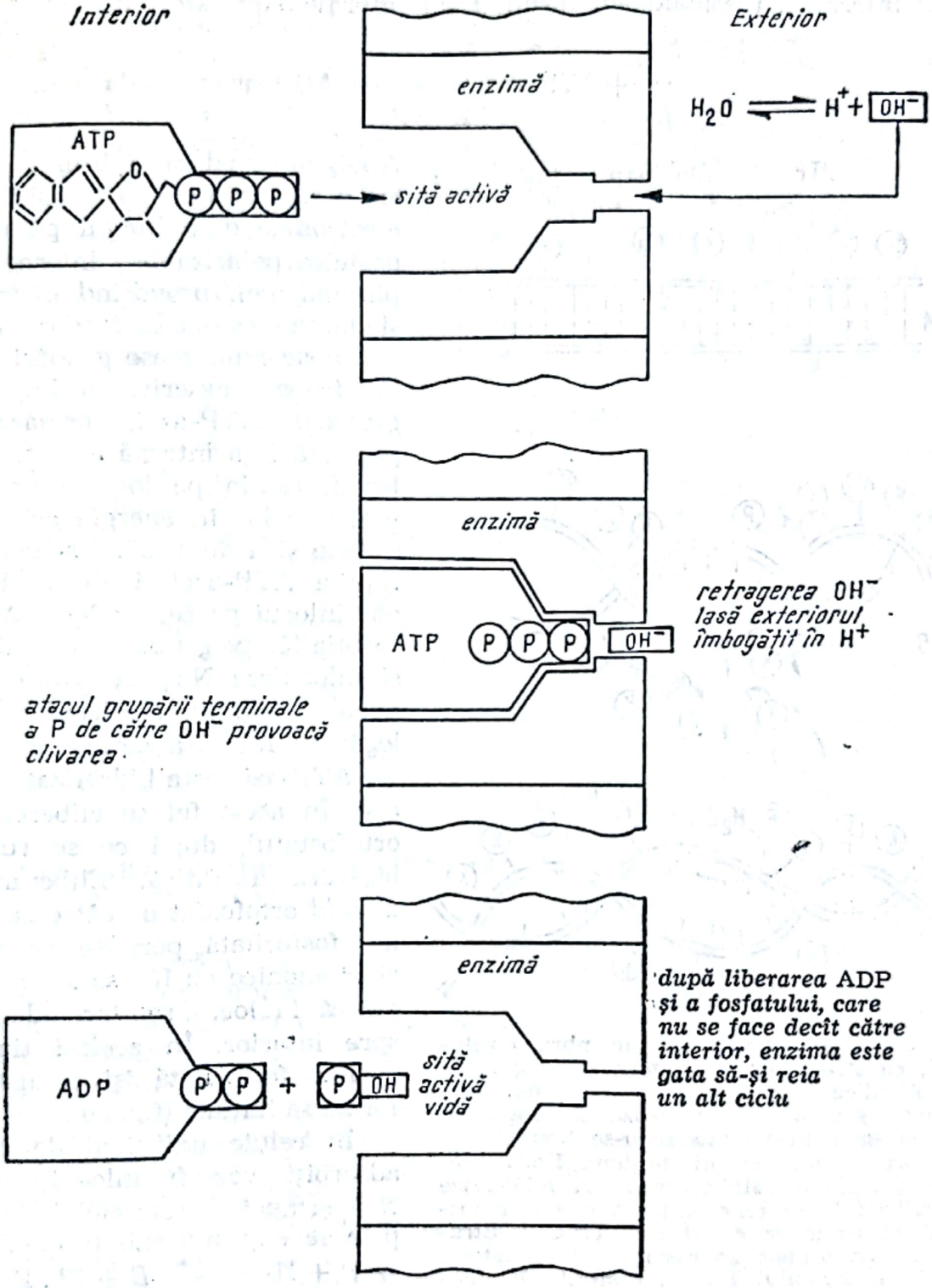


Fig. 29. Într-o membrană, molecula asimetrică a ATP-azei poate provoca, în timpul hidrolizei, scindarea moleculei de ATP în ADP și P, deplasînd ionii OH^- de la exterior la interior. Pentru că produsul $[H^+]$ cu $[OH^-]$ rămîne constant (1×10^{-14} la 25°C), scăderea OH^- este însoțită de creșterea H^+ în compartimentul extern (după L e h n i n g e r).

Scanned with OKEN Scanner

macromoleculară energizantă activează centrele ATP-azice presărate pe fața internă a plasmalemei, formînd un intermediar fosforilat :

$$\begin{matrix}\mathrm{Na}\\ \cdot\cdot\\ E\end{matrix} + \mathrm{ATP} \rightleftharpoons \begin{matrix}\mathrm{Na}\\ \cdot\cdot\\ E \sim \mathrm{P}\end{matrix} + \mathrm{ADP}$$

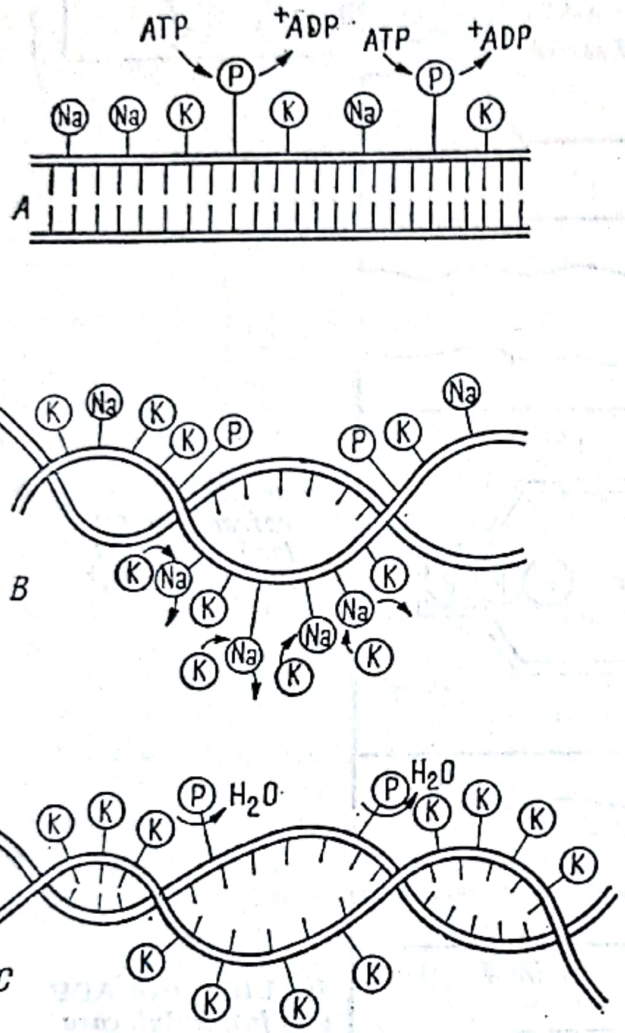


Fig. 30. A — o parte din membrana celulară, cu stratul proteic intern și complexele fosfolipidice perpendiculare pe suprafață. Grupările anionice formează prelungiri în hialoplasmă, la ele asociindu-se Na^+ și K^+, care constituie perechi de ioni. Două prelungiri mai lungi sînt centre active ATP-azice specifice ; *B* — reprezentarea efectelor fosforilării centrilor activi ai ATP-azei. Stratul intern proteic al membranei se rotește în jurul stratului lipidic. Centrele P_i enzimatice, fosforilate, rezistă rotației, dar are loc un schimb de ioni de Na^+ cu ioni de K^+, astfel că Na^+ este eliminat ; *C* — în urma redistribuirii densității electronice prin fixarea K^+, centrul fosforilat al enzimei este hidrolizat și se eliberează PO_4^{--} anorganic.

Apoi, dintr-odată și brusc, are loc o redistribuire a densității electronice de-a lungul păturii proteice polarizabile interne a plasmalemei, provocînd distorsionarea acesteia. În felul acesta se rotesc numeroase grupări anionice spre exterior, în timp ce grupările ATP-azei, presărate pe toată fața internă a plasmalemei, rămîn pe loc. În urma schimbărilor în energia de absorbție și a deformării structurale a ATP-azei, ionii de K^+ vor înlocui pe cei de Na^+. Absorbția K^+ pe grupările anionice și înlocuirea Na^+ determină o nouă densitate electronică și legătura fosfat a centrului activ ATP-azic este hidrolizată de apă. În acest fel se eliberează ortofosfatul, după ce se rupe legătura fosfatică. Eliberarea acestui ortofosfat de către enzima fosforilată permite grupărilor anonice cu K^+ să se răsucească la loc, reîntorcîndu-se spre interior. În același timp enzima fosforilată își recapătă forma sa inițială (fig. 30).

În celule unii ioni de K^+ adsorbiți vor fi înlocuiți cu Na^+ și apoi se reia ciclul. Etapele se exprimă sub forma : $E \sim \mathrm{P} + \mathrm{H_2O} \xrightarrow{K^+} E + P'$. Pentru ca plasmalema să pompeze Na^+, ATP-aza trebuie să aibă o configurație spațială efemeră prin care să se modifice afinitatea pentru K^+ a feței externe

a plasmalemei. Printr-o „deformare" moleculare a plasmalemei, aceasta se rotește întîi către exterior și apoi către interior (fig. 31).

Într-o altă concepție, oarecum asemănătoare, ATP-aza sensibilă la K^+, Na^+ ocupă toată grosimea membranei și acționează asupra ATP — Mg — 3 Na^+. Deci la hidroliza unei molecule de ATP de către ATP-ază, cu eliberarea unui fosfat anorganic (~ P), 3 ioni de Na^+ trec în schimbul a 2 ioni de K^+. Sub această formă a enzimei, sodiul nu poate fi înlocuit de alt cation monovalent dar complexul ATP — Mg — $3Na^+$ determină trecerea macromoleculei de ATP-ază într-o altă formă în care ionii de Na^+ ai complexului se pot schimba cu cei de K^+ de pe fața externă a plasmalemei. În astfel de stare ionii de K^+ sînt izolați de fața internă, dar numai efemer, deoarece ATP este hidrolizat și macromoleculele trec în forma lor inițială permițînd ionului de K^+ să vină în interior. Hidroliza ATP ar fi catalizată parțial de o grupare aminoacidă cu sarcini pozitive, care era pînă la un moment dat ținută departe de substrat din cauza sarcinilor celor 3 ioni de Na^+.

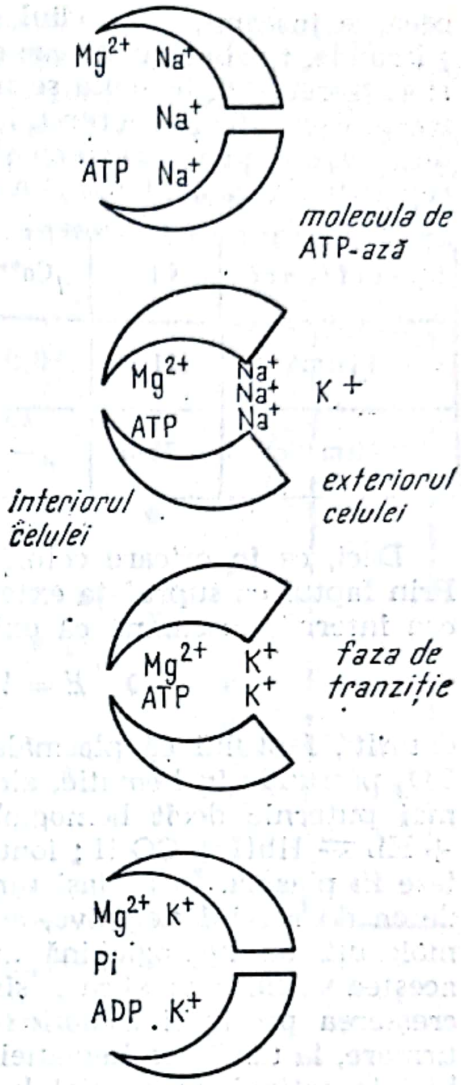


Fig. 31. Diagrama cupei (K^+,Na^+) — ATP-azice, în care constituția enzimei din cele două subunități nu este obligatoriu identică.

1.4.4. PARTICULARITĂȚILE CELULARE ALE PERMEABILITĂȚII

Dacă comparăm proprietățile calitative generale ale membranei hematiei cu acelea ale neuronului sau fibrei musculare striate, constatăm că există o serie de deosebiri. Astfel, membrana hematiei are o mare permeabilitate pentru apă, o permeabilitate bună pentru anioni, mică pentru cationi și este impermeabilă la trecerea proteinelor. Neuronul, în comparație cu eritrocitele, prezintă o repartiție a Na^+ și K^+ asemănătoare, în schimb nu conține Cl^- intracelular. Sarcinile sale negative intracelulare sînt purtate de anioni de izotianați, aspartați, glutamați succinați etc., total nedifuzibili. În continuare, vom încerca să analizăm mai amănunțit aceste afirmații.

Forma de disc biconcav a hematiei de la mamifere are avantajul de a oferi o rezistență mai mare la ruperea membranei și o suprafață crescută în raport cu volumul, care favorizează difuzia O_2 din plasmă în interior. Moleculele de O_2, pe măsură ce pleacă în același timp din oricare punct de pe membrană, ajung deci simultan în centrul hematiei. În soluție de NaCl, sub o concentrație de 0,9 g %, hematiile *plasmolizează* la 0,5 g,

Scanned with OKEN Scanner

ceea ce înseamnă că sodiul nu difuzează prin membrană ci numai apa pătrunde, tinzînd să egaleze concentrația de la interior cu cea de la exterior. Nereușind, hematia se umflă pînă plesnește. Pe de altă parte, ureea trece ușor prin membrană, iar dacă se pun hematii într-o soluție numai de uree ele hemolizează ca și cum ar fi în apă pură. În plus, există și o repartiție inegală a ionilor în mediul extern și în hematie [1] :

Specificare	Cl^-	Ca^{++}	Mg^+	Na^+	K^+	Hb	Glucoză
Plasmă	111	3,2	1,07	144	5	0	43
Hematie	73-5	—	2,8	12,2	150	50	43

Deci, ca în oricare celulă, sodiul este extra- și potasiul intracelular. Prin faptul că suprafața externă a plasmalemei este pozitivă în raport cu cea internă, înseamnă că există și o diferență de potențial măsurabilă :

$$E = V_{ext.} - V_{int.} \neq 10 \text{ mV},$$

datorită faptului că plasmalema este permeabilă la anioni. Într-adevăr, CO_2 pătrunde în hematie, aici se hidratează în CO_3H_2 care, fiind un acid mai puternic decît hemoglobina, o deplasează după reacția : $CO_3H_2 + Hb \rightleftharpoons HbH + CO_3H$; ionul CO_3H^- acumulîndu-se în exces în celulă, iese în plasmă. În același timp intră ioni de Cl^- care compensează pierderea de sarcini negative, asigurîndu-se compensarea sarcinilor. Fiecare moleculă de hemoglobină are circa 10 sarcini electrice și, pentru ca acestea să fie neutralizate, sînt necesari 10 anioni mici, fapt care duce la creșterea presiunii osmotice interioare, la intrarea solventului și, prin urmare, la umflarea hematiei. Membrana hematiei este însă slab permeabilă la cationi, în special la potasiu : hematiile păstrate la 0°C lasă să iasă K^+, dar dacă se readuc la 37°C atunci K^+ reintră în hematii. Pe de altă parte, inhibarea glicolizei face imposibil acest transport al K^+. În acest transport energia este dată de metabolismul glucozei. Dacă diferența de potențial a membranei hematiilor este în jur de 10 mV, cea a neuronilor este mult mai mare, atingînd pînă la 90—100 mV. Această valoare se stabilește măsurînd cu un microelectrod de 100 Å Ø intramembranar și cu altul așezat pe suprafața membranei. Or, dacă pentru 100 Å există un potențial de leziune de 100 mV, pentru 1 cm este de 100 000. Deci, această sarcină electrică este dată de existența unor diferențe de concentrații ionice de o parte și de alta a membranei.

Pe baza acestor date se iau în considerare forțele de difuzie și cele electrostatice (de atracție și respingere) ce se exercită asupra diferiților ioni mai mici din celule și din afara lor. K^+ este concentrat în celule fiind supus unor forțe mari de difuzie care tind să-l scoată din celulă. În schimb, forțele electrostatice, ținîndu-se seamă de semnul lor, tind să-l

[1] în mEq.

Scanned with OKEN Scanner

reţină. Cele două forţe acţionează în sens contrar, echilibrîndu-se şi menţinînd astfel marea concentraţie de K^+ intracelulară. Cl^- se află într-o situaţie inversă, întrucît forţele de difuzie îl fac să intre în celulă, iar forţele electrostatice îl reţin în afară. Ionii de Na^+ sînt într-o situaţie specială, forţele de difuzie şi cele electrostatice acţionînd ambele în acelaşi sens fac ca Na^+ să intre în celule. Diferenţele de concentraţie observate impun impermeabilitatea pentru Na^+ a fibrelor musculare şi a neuronilor în repaus.

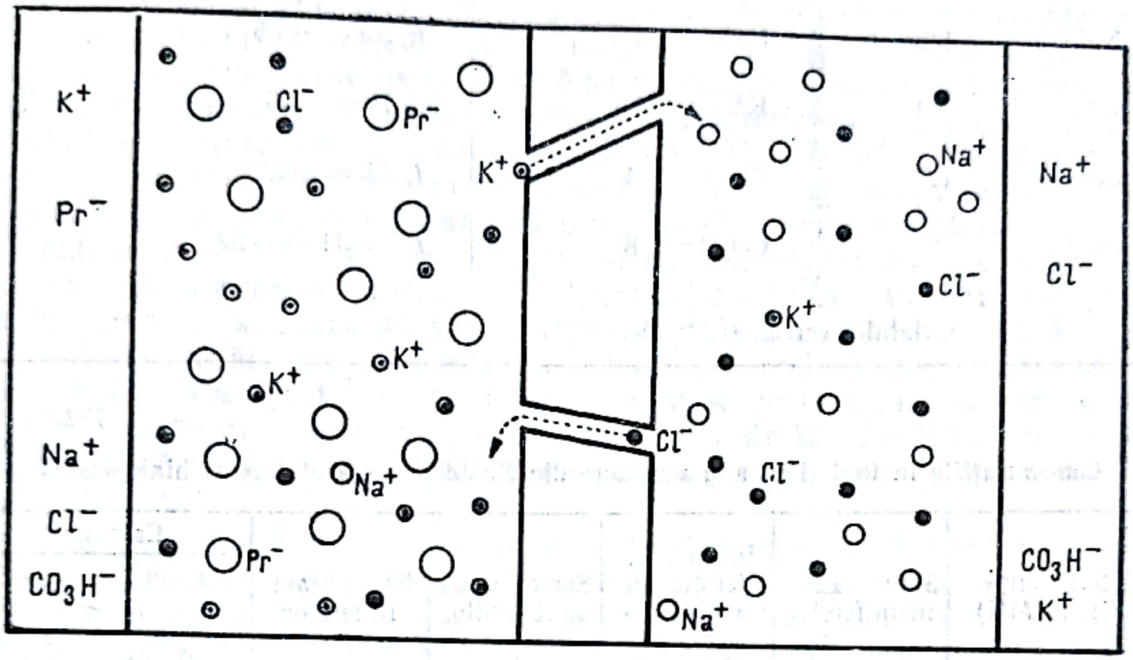


Fig. 32. Concepţia lui **Ruch** şi **Patton** considerînd membrana poroasă care separă celula de exterior. Prin pori pot trece numai ionii de K^+ şi Cl^-, nu cei de Na^+ şi anionii proteici.

Admiţînd schema lui T. **Ruch** şi H. **Patton** (fig. 32), concepem membrana ca fiind poroasă, prin pori putînd trece liber ionii de K^+ (2,4 Å) şi Cl^- (2,3 Å), care sînt mari ca şi anionii proteici intracelulari. Datorită ciocnirilor provocate de agitaţia termodinamică dintre moleculele de apă şi ioni, ultimii capătă o energie cinetică suficientă ca să traverseze porii membranei, dacă direcţia deplasării lor nimereşte porii şi dacă diametrul lor este mai mic ca al porilor. Sistemul celular fiind în echilibru, în fiecare moment trec tot atîţia ioni din interior cîţi vin din afară. Presupunînd pentru început că nu este vreo diferenţă de potenţial între hialoplasmă şi mediul extracelular, atunci K^+ va părăsi celula tinzînd să echilibreze concentraţiile dintre cele două compartimente. Anionii proteici nu pot ieşi fiind mari şi nici Na^+ nu-l poate înlocui din afară, aşa că hialoplasma se încarcă negativ datorită sarcinilor anionilor proteici, iar exteriorul celulei devine pozitiv datorită Na^+. Tot astfel şi Cl^-, care se află în exces la exterior, trece în celulă mărind numărul sarcinilor pozitive din exterior şi a celor negative din interior. Astfel se dezvoltă între compartimente un gradient de potenţial de sens opus de difuzie, care se va echilibra într-un timp oarecare.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3

Concentraţiile ionice din fibre musculară a broaştei
(după R u c h şi F u l t o n)

Valori experimentale				Potenţial de echilibru: $V_{ext.} - V_{int.} = \frac{RT}{FZ} \cdot \log \cdot \frac{C_1}{C_2}$
Concentraţiile ionice din plasmă exprimate în mEq/l		Concentraţiile ionice din sarcoplasmă în mEq/l		
Na^+	145	Na^+	12	E Na = +65
K^+	4	K^+	155	E K = −95
Cl^-	120	Cl^-	4	E Cl = −90
CO_3H^-	27	CO_3H^-	8	E CO_3H = −32

membrana sarcoplasmică

Potenţialul electric — 90 mV.

Tabelul 4

Concentraţiile în ioni şi în alte substanţe din lichidele extracelulare şi hialoplasmă

Substanţe (în m M/l)	Sarcoplasma mamiferelor	Plasma interstiţială a mamiferelor	Sarcoplasma amfibienilor	Plasma amfibienilor	Calmar: axon	Calmar: sînge
K^+	115	4	124	2,55	400	20
Na^+	12	145	10,4	309	50	440
Ca^{++}	—	—	4,9	2,1	0,4	10
Cl^-	4	120	1,5	77,5	40—150	560
Alte substanţe	155	7	71	11	330	—

D. G o l d m a n n (tab. 3 şi 4) presupune că membrana celulară are pe toată grosimea sa un cîmp electric constant, astfel că diferenţa de potenţial este :

$$E_m = \frac{RT}{F} \log. e \frac{P_K (K^+)_{ext.} + P_{Na} (Na^+)_{ext.}}{P_K (K^+)_{int.} + P_{Na} (Na^+)_{int.}} + \frac{P_{Cl} (Cl^-)_{int.}}{P_{Cl} (Cl^-)_{ext.}},$$

în care R este egal cu 8,31 jouli/mol/grade de temperatură absolută ; T-temperatura absolută ; e-baza logaritmilor naturali (2,718) ; F-96 600 coulombi ; P-coeficientul de permeabilitate membranară pentru ionii măsuraţi dat în numărul echivalent de ioni ce trec printr-un cm^2 de membrană/s, cînd diferenţa de o parte şi de cealaltă a membranei este de

Scanned with OKEN Scanner

1 echivalent de ioni/ml, diferența de potențial fiind egală cu 0. Astfel există un acord perfect între valorile măsurate experimental și cele calculate după ecuația lui Goldmann, în cazul cînd coeficienții de permeabilitate sînt bine calculați.

Deci, ca fibra nervoasă sau musculară să aibă potențial de repaus, intrarea Na^+ trebuie să fie împiedicată. Membrana pare o barieră în calea intrării Na^+. Totuși, aceasta este numai o aparență, deoarece, așa cum au arătat A. Hodgkin și R. Keynes, sodiul totuși pătrunde în celulă. Scufundînd o fibră nervoasă gigantă de calmar în $^{24}Na^+$, acesta se găsește în fibră într-o proporție de 60.10^{-12} mol/cm²/s, iar trecerea în axoplasmă a sodiului se face multă vreme și fără să se modifice potențialul de repaus. Dacă o asemenea fibră radioactivă este scufundată în $^{23}N^+$, se constată după cîtva timp că mediul este mai radioactiv. Deci $^{24}Na^+$ a ieșit din fibră contra gradientului de concentrație, deci printr-un *transport activ*.

Fenomenul este posibil datorită unui aport energetic metabolic, fiind inhibat de 2,4-dinitrofenol și cianură și activat de fosfatul de arginină. Scăderea temperaturii micșorează afluxul Na^+ la un simplu transport pasiv. Această pompare afară a Na^+ este cuplată cu pomparea înăuntru a K^+. Într-adevăr, prin folosirea $^{40}K^+$ în același model experimental ca în cazul $^{24}Na^+$, s-a văzut cum din fibrele nervoase de sepie, calmar sau crab ies 22×10^{-12} moli/cm²/s K^+, și cum cantitatea de K^+ din fibră nu scade, înseamnă că el este pompat înăuntru contra gradientului de concentrație și electrostatic.

„Pompele" de K^+ și Na^+ sînt cuplate deoarece, dacă suprimăm K^+ din mediul extern, transportul activ al Na^+ în afara celulei scade cu 30%. O fibră nervoasă de calmar în care s-a injectat $^{24}Na^+$, și pusă în apă de mare (izotonică cu plasma cefalopodului), fără K^+, nu elimină decît *puțin* Na^+ radioactiv și nu va pompa afară sodiul în mod normal decît dacă se adaugă K^+ în apă.

Fluxurile de ieșire a Na^+ și de intrare sînt sub dependența metabolismului, deoarece, decuplînd cu dinitrofenol sinteza ATP din ADP și fosfat anorganic, se scade enorm pomparea în afară a Na^+. Tot astfel, prin blocarea metabolismului oxidativ cu azotură sau cianură se inhibă fluxul de ieșire al Na^+. Injectînd apoi ATP în astfel de celule „blocate", fluxul crește din nou proporțional cu cantitatea de ATP injectat.

Era de mult cunoscut un fenomen din fiziologia tegumentului prin care pielea de broască „in vitro" poate scoate ClNa din mediul exterior, eliminîndu-l în mediul interior. În felul acesta broasca în mod natural își asigură constanța mediului interior, putînd extrage ClNa chiar de la o concentrație de 10^{-5}M în apa dulce în care ea trăiește. H. Ussing, studiind fenomenul cu radioizotopi, consideră că numai Na^+ este transportat activ împotriva cîmpului electric. Modelul experimental „cu pielea de broască scurt-circuitată" (fig. 33) constă dintr-un fragment de piele care separă două compartimente cu soluție Ringer de aceeași compoziție. Se stabilește în mod experimental între cele două fețe ale pielii o diferență de potențial de 0 și apoi se măsoară cu microampermetrul curentul care traversează instalația. Cum este și de așteptat, concentrația și potențialul electric fiind identice, nu ar apare nici un gradient electric sau de concentrație. Și totuși, cu ajutorul microampermetrului, se poate surprinde o cantitate de curent mică, generată de piele. Ussing a mă-

Scanned with OKEN Scanner

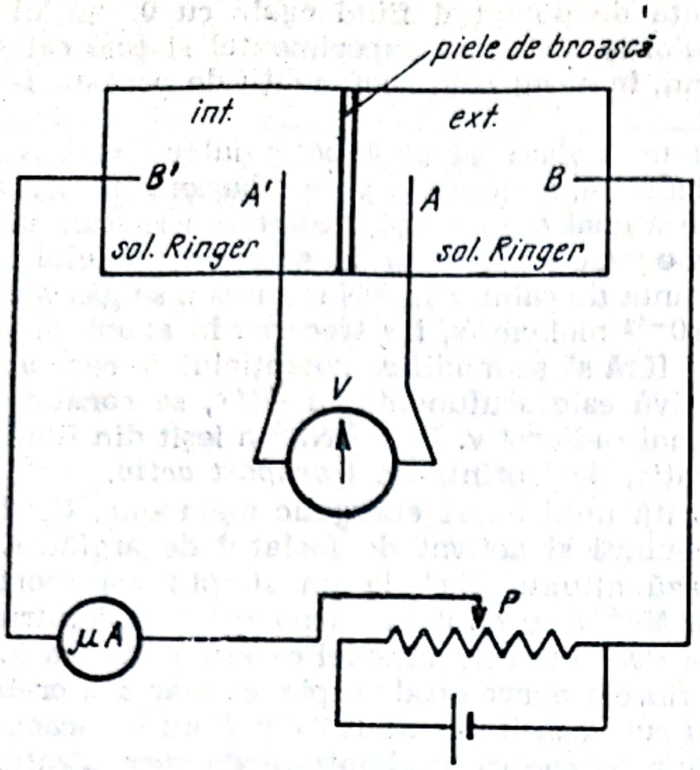


Fig. 33. Dispozitivul experimental al lui Ussing în care, reglînd potenţiometrul (*P*) aşa fel ca voltmetrul (*V*) să arate 0, putem măsura diferenţa de potenţial ; *B*, *B'* — cele 2 compartimente ale dispozitivului separate prin pielea de broască ; *A*, *A'* — electrozii voltmetrului.

surat fluxul în ambele sensuri, pentru diferiţii ioni, şi a stabilit următoarele fapte : Cl^- prezintă cele două fluxuri egale, deci acest anion este în echilibru şi nu contribuie la generarea vreunui curent. La fel se comportă şi K^+. În schimb, cele două fluxuri de Na^+ nu sînt egale deoarece fluxul intrînd reprezintă 105% din curent iar cel ieşind abia 5%. Fluxul net, care este diferenţa dintre cele două fluxuri (fluxul intrînd-fluxul ieşind) este egal cu curentul produs. Pielea de broască prezintă, deci, un singur transport activ, acela pentru Na^+, în timp ce alte membrane ca aceea a hematiei şi a neuronului transportă mai mulţi ioni. Din acest punct de vedere, epiteliul vezical prezintă cea mai simplă membrană. S-a putut stabili, în cazul pielii de broască, faptul că stratul cel mai profund al păturii germinative prezintă şi cea mai mare valoare a diferenţei de potenţial. Aceste celule germinative tinere difuzează pasiv Na^+ prin faţa lor externă şi-l pompează activ afară prin faţa bazală. Deci, chiar la aceeaşi celulă, membrana nu are aceleaşi proprietăţi pe toată întinderea ei : prin polul apical Na^+ pătrunde pasiv în celulă şi este pompat activ prin polul bazal.

Două experienţe sugerează mecanismul acestei pompe de sodiu. Astfel, în eritrocite şi neuroni, unde membrana expulzează Na^+ şi introduce K^+ se constată că cele două fluxuri ale lor sînt dependente, deoarece fluxurile sînt de acelaşi ordin de mărime. Doi ioni de sodiu scoşi sînt înlocuiţi cu unul de potasiu. Amîndouă fluxurile depind de concentraţia externă a potasiului (K^+) extern. În absenţa potasiului la exterior, fluxul ieşind al sodiului rămîne la 30% din valoarea sa iniţială.

A. Hodgkin şi R. Keynes au realizat o experienţă prin care au dovedit acest cuplaj dintre Na^+ şi K^+. Un axon gigant de calmar a fost injectat cu sodiu radioactiv, după care a fost plasat în apă de mare normală. Probele luate din timp în timp dovedesc că sodiul radioactiv a trecut în afară şi, cu timpul, se elimină tot pînă cînd în apa de mare de la exterior nu se mai înregistrează nici o radioactivitate. Dacă în timpul acesta, cît se detectează o radioactivitate în apa de mare în care stă axonul, se înlocuieşte apa cu una fără K^+, radiosodiul scade brusc în noul

Scanned with OKEN Scanner

mediu. Valoarea sa revine la normal, dacă se pune axonul în apă de mare cu K^+. Deci K^+ este necesar ritmului normal al pompei de sodiu. Examinînd curba fluxului intrînd al K^+ din figura 34 se constată că, la concentraţiile mici de K^+, fluxul intrînd al K^+ creşte repede. Acest aspect se datoreşte mişcării active a pompei de K^+, al cărui mecanism intim este realizat de către transportori. Aceştia captează activ K^+, chiar dacă este într-o slabă concentraţie. Cînd se ajunge la o concentraţie mai mare, transportorul *X* se saturează şi toate posibilităţile de transport activ sînt atinse (transportorul este saturat). Atunci se înregistrează cotul curbei, după care creşterea fluxului este o simplă difuzie pasivă. În urma unui aport energetic celular de ATP, transportorul devenit *Y* poate duce sodiul de la interior spre suprafaţa membranei celulare, unde-l descarcă în afară datorită unei enzime care-l dezactivează şi care este inactivată de ouabaină (fig. 35).

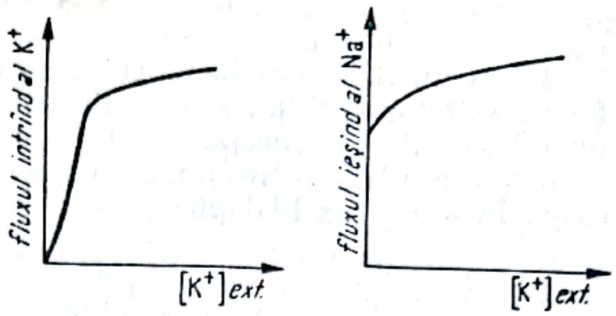


Fig. 34. Cuplajul fluxului ieşind al Na+ cu fluxul intrînd al K+ (după F. Grémy J. Pagès).

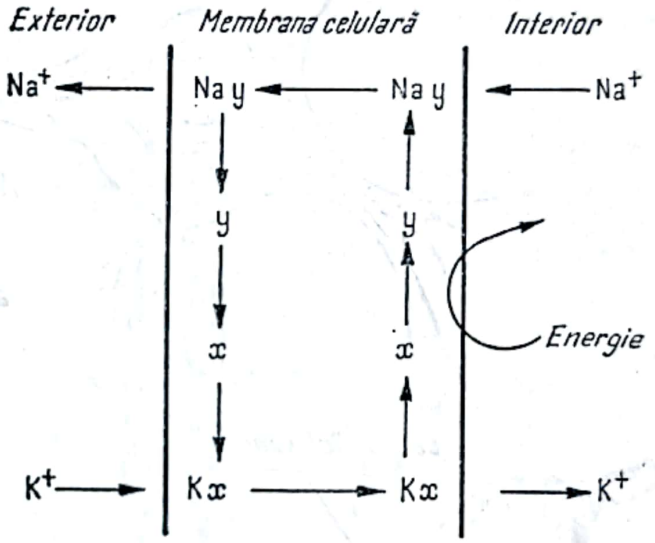


Fig. 35. Concepţia transportului activ (schemă).

Lucrările lui C. Duncan (1967) au arătat că o anumită ATP-ază devine „deformabilă" în prezenţa substratului său. Extrăgîndu-se ATP-aza din membranele multor celule s-a constatat că sînt de două feluri : ATP-aza *A*, inhibată de Ca^{++} şi de ouabaină şi activată de Na^+ şi K^+, care hidrolizează mai uşor ATP decît ITP [1] sau ADP ; ATP-aza *B*, activată de Ca^{++}, neblocată de ouabaină şi indiferentă la Na^+ şi K^+. Ultima, foloseşte la fel de bine ATP ca şi ADP sau ITP. Activitatea lor este însă condiţionată de integritatea arhitectonicii fosfolipidice a membranei celulare. Lecitinaza sau lipaza distrug potenţialul de repaus şi fac fibra nervoasă total inexcitabilă. Se presupune că ATP-aza *A* este folosită în pomparea cationilor în sensul că, hidrolizînd moleculele de ATP, dă energia necesară transportului activ. ATP-aza *B* are rol în permeabilitatea membranei pentru sodiu, datorită proprietăţilor sale mecanoenzimatice. Deblocarea sa se face prin deplasarea Ca^{++}, şi astfel i se schimbă configuraţia moleculară, permiţîndu-se pătrunderea sodiului.

[1] ITP = inozintrifosfat.

Scanned with OKEN Scanner

Teaca lui Schwann joacă rolul de conducere a influxului nervos sub formă saltatorie. Studiile de microscopie electronică au arătat că de-a lungul axonilor, la începutul dezvoltării embrionare a sistemului nervos, se înșiră celulele Schwann care încep să se înruleze în jurul fiecărui axon. În acest caz hialoplasma din partea care se înfășoară dispare, iar

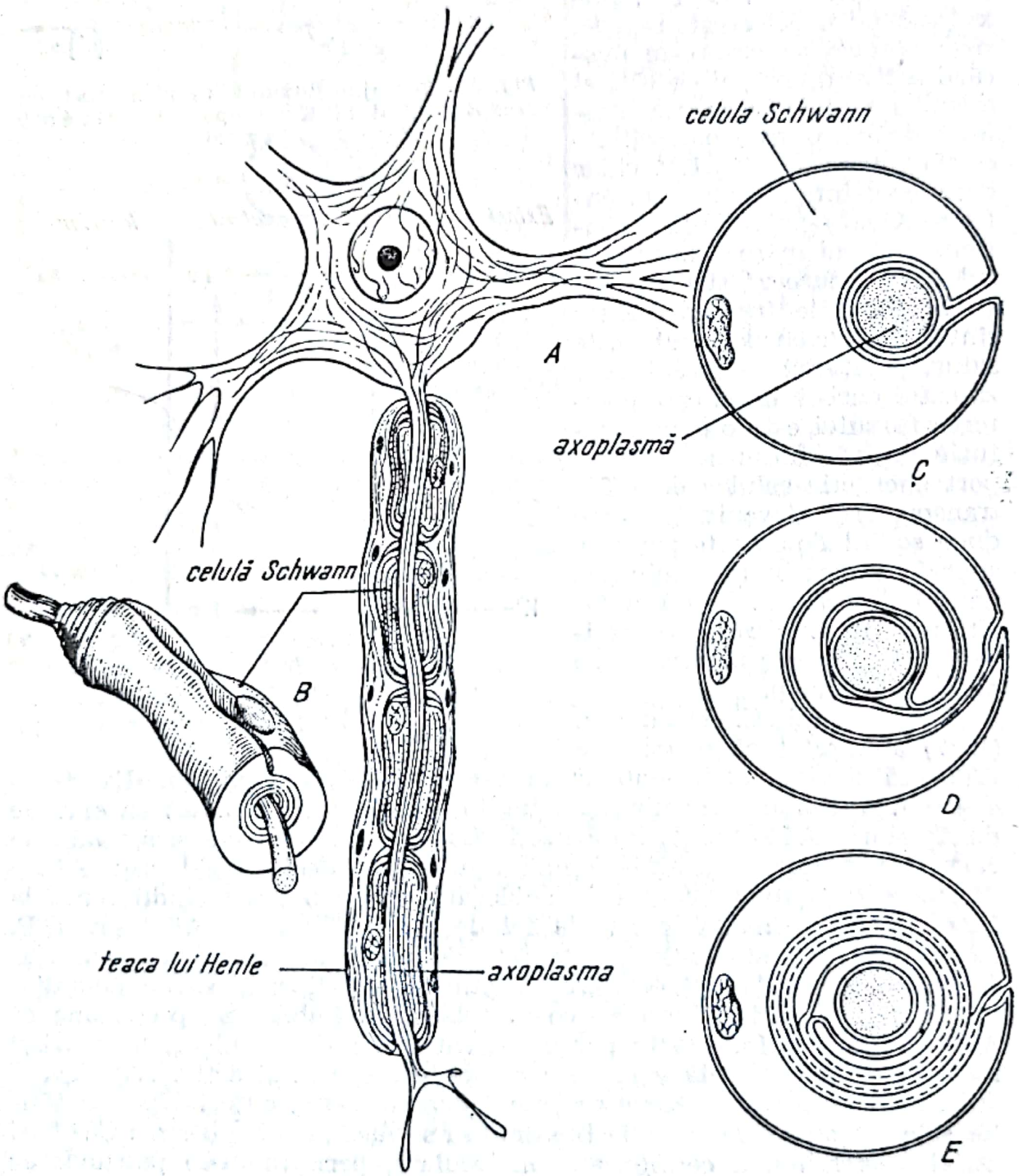


Fig. 36. Organizarea fibrei mielinice : *A* — neuronul ; *B* — înfășurarea celulei Schwann în jurul axonului ; *C, D, E* — secțiune transversală în celula Schwann, în diferite stadii de înfășurare.

Scanned with OKEN Scanner

membranele celulare ale turelor se lipesc unele de altele. Tot astfel dispare și spațiul intercelular dintre turele vecine, așa încît membranele turelor învecinate se alipesc (fig. 36).

La microscopul electronic, în secțiune transversală, înfășurarea celulelor Schwann apare în final ca un rulou format dintr-o foiță întunecată de 30 Å care, la fiecare tură, este separată de foița următoare de un spațiu de 120 Å în mijlocul căruia se află o bandă densă tot de 30 Å grosime. Banda densă reprezintă membranele celulare alipite în urma dispariției spațiului hialoplasmatic. Acest rulou de membrane plasmatice atinge cîțiva microni grosime, iar mielina tecii Schwann este, în fond, componenta fosfolipidică și proteică a membranei (fosfolipide, colesterol, cerebrozide, proteine).

Teaca este impermeabilă la apă și substanțe hidrosolubile. Între fiecare celulă Schwann înfășurată există un spațiu — strangulația Ranvier — unde axolema vine în contact direct cu exteriorul și pe unde au loc schimburile cu mediul.

Teaca de mielină a fost considerată ca un teanc de mici condensatori montați în serie, dielectricul fiind dat de lipidele sale. Capacitatea totală a tecii de mielină este deci foarte mică, în comparație cu a membranei din dreptul strangulației Ranvier. În fibra mielinică potențialul de acțiune progresează în mod *discontinuu*. El apare la nivelul unei strangulații Ranvier, naște curenți locali, dar ei nu pot depolariza membrana dedesubtul nivelului critic decît la strangulația următoare. I. Tasaki a imaginat metode ultrafine cu care demonstrează această teorie. Dacă se măsoară pragul reobazic[1] al unei fibre mielinizate izolată, și aplicînd curentul excitant cu un microelectrod care se poate deplasa longitudinal (fig. 37), se găsesc valori de 4—5 ori mai mari la nivelul unui internod decît în dreptul unei strangulații Ranvier. Deci strangulațiile au o conductibilitate mai mare și constituie locul de trecere preferat al curenților locali.

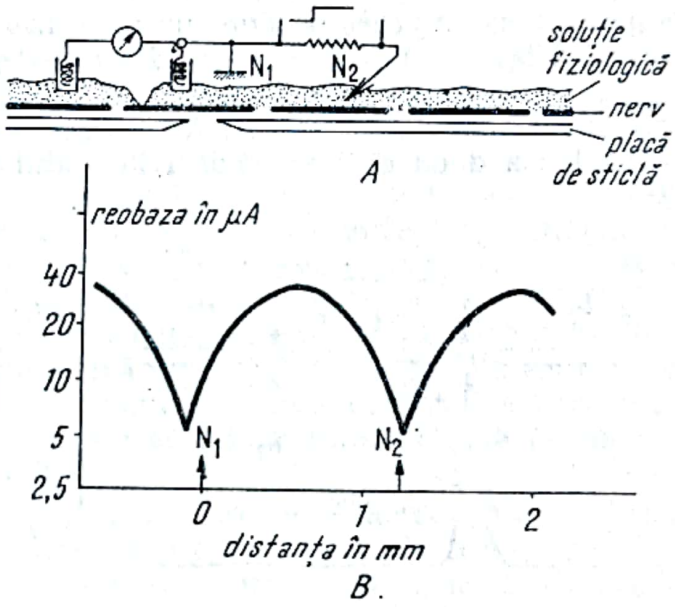


Fig. 37. A — schema experienței lui Tasaki pentru demonstrarea existenței unei foarte importante creșteri a excitabilității la nivelul fiecărei strangulații Ranvier a unei fibre nervoase mielinizate izolate; *B* — variațiile intensității liminare reobazice în funcție de distanța separatoare dintre microelectrodul stimulator și strangulațiile Ranvier N_1 și N_2 (după Tasaki, 1968).

[1] Începînd de la un oarecare timp util, intensitatea curentului necesar pentru a atinge pragul de răspuns (intensitatea liminară) nu mai descrește oricît am mări timpul de trecere al curentului. Această intensitate a fost denumită de L. Lapicque *reobază*.

Scanned with OKEN Scanner

Evidenţierea curenţilor locali se face tot printr-un dispozitiv al lui Tasaki în care fibra nervoasă izolată este aşezată în 3 compartimente pline de lichid nutritiv şi separate prin pereţi goi, largi de 1 mm, în dreptul cărora fibra este în contact direct cu aerul. Aşa se poate obţine o rezistenţă mare între două compartimente alăturate, iar diferenţele de potenţial care apar între ele sînt puţin scăzute de către şuntul determinat de stratul subţire de lichid care acoperă fibra la nivelul pereţilor goi. Se poate menţine, deci, o rezistenţă ridicată a fibrei, picurînd pe ea o soluţie de o conductibilitate slabă, izotonizată cu zaharoză, care să împiedice uscarea preparatului. Dacă electrodul este plasat într-un compartiment cu strangulaţie sau într-unul fără, înregistrările sînt diferite. Cînd electrodul se află în compartimentul cu numai un electrod, nu se înregistrează decît curenţi locali mici, care ies din fibră după ce au traversat teaca de mielină foarte rezistentă. Cum în dispozitiv (fig. 38, *A*) fluxul se propagă de la $N_1 \rightarrow N_2$, N_1 se depolarizează mai întîi „în puţ" ca în vechea concepţie a lui Hermann. Curenţii care ies prin membrana internodală dau prima deflexie din a doua deflexie (fig. 38, *B*), apoi se depolarizează N_2 care produce un alt flux mic de curenţi ce ies prin membrană (fig. 38, *C*). Intervalul dintre *a* şi *b* reprezintă perioada care separă cele două depolarizări din N_1 şi N_2. Introducînd un anestezic bine dozat în compartimentul cu N_2, *b* dispare, ceea ce demonstrează că a avut loc a doua deflexie, adică la nodul sau strangulaţia a doua. Cînd

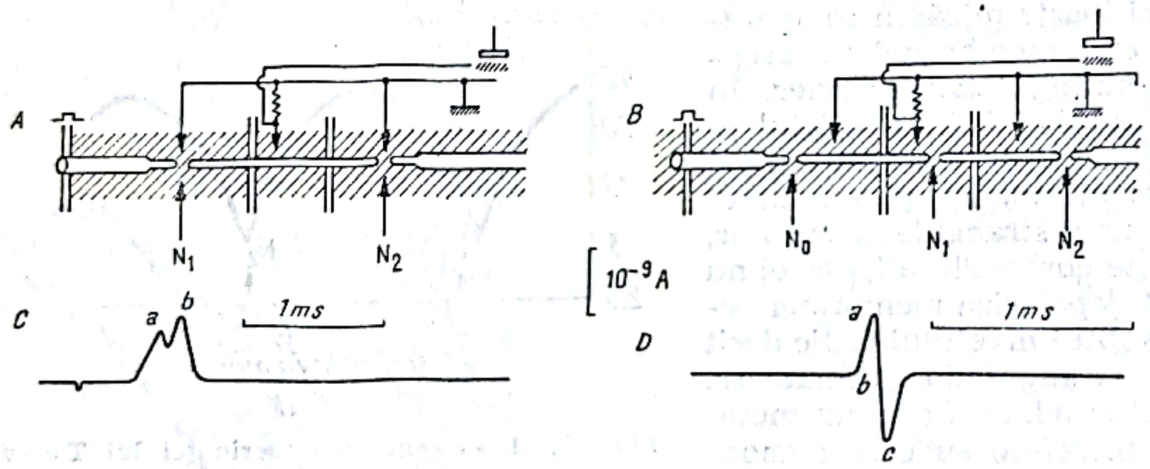


Fig. 38. Dispozitivul experimental al lui Tasaki pentru demonstrarea realităţii teoriei saltatorie a diferenţei de răspunsuri înregistrate la nivelul internodului (*A*) şi a unei strangulaţii Ranvier (*B*) la o fibră mielinizată izolată (după I. Tasaki, 1968); *C* şi *D* — înregistrările grafice respective.

electrodul înregistrator este aşezat la nodul N_1 (strangulaţia N_1) se înregistrează un flux de curent care iese datorită depolarizării pasive din N_1 de către curenţii locali proveniţi prin depolarizarea nodului N_0 dinainte (fig. 38, *D*) şi care sînt reprezentaţi prin curba ascendentă *a*. Apoi ramura descendentă *b* indică un flux de pătrundere a Na^+ în fibră, iar porţiunea c corespunde unei repolarizări a fluxului de ieşire a K^+. Cocaina compartimentului N_1 produce deflexia descendentă, ce se reduce mult în lipsa Na^+.

Astfel s-a putut calcula pentru o fibră mielinică (n. sciatic de broască) de 14 μ Ø, care conduce influxul cu 23 m/s^{-1} la 20°C, că rezistenţa tecii

Scanned with OKEN Scanner

de mielină este cuprinsă între 0,1 și 0,16 $M\Omega\ cm^{-2}$ și capacitatea ei de 0,0025—0,005 $\mu F\ cm^{-2}$, în timp ce axolema strangulației (nod) Ranvier are 10—20 $M\Omega\ cm^{-2}$ și 3—7 $\mu F\ cm^{-2}$. S-a mai stabilit că fluxul intrînd al Na^+ este de 300 ori mai mic la noduri ca la internoduri, astfel că după aceea energia necesară scoaterii Na^+ este foarte mică. Pe lîngă faptul că în fibrele mielinice influxul nervos se propagă mai repede, cam de 20 ori mai mult față de o fibră amielinică de același diametru, și metabolismul primelor (mielinice) este mai mic, avînd o cheltuială mai redusă de energie.

1.4.6. MEMBRANA — SUPORT AL ANTIGENELOR DE SUPRAFAȚĂ

În ultimii ani se consideră suprafața membranei celulare ca o structură „în mozaic." Membrana eritrocitară studiată prin *metoda criogravurii* poartă înăuntrul său granule care proemină la suprafața ei. Membrana eritrocitară umană conține 40—50% proteine, 35—45% lipide și circa 10—14% hidrați de carbon. Din proteinele membranare 9% sînt lipoglicoproteine cu GM 250 000. Pinto de Silva (1971) a arătat că situsurile de legătură antigenice A ale eritrocitelor umane sînt asociate tocmai de granulele membranare. Eritrocitele umane tratate cu enzime, viruși și filtrate bacteriene evidențiază receptori membranari mascați și asemenea tratamente duc la abolirea aglutinării celulelor. Dealtfel, în decursul anilor s-au putut evidenția pe suprafața membranară situsuri de grupări active biologice, antigene și situsuri receptoare pentru viruși. Sînt cunoscute sistemele antigenice membranare : heterofil, de specificitate a speciei, A_1, A_2, *O*, *M*, *N*, *S*, *d*, *P*, *Rh*, Lutheran, Koll, Lewis, Duffy, Kidd, Diego, *Jt*, *Xg*, Dombrock, ale eritrocitelor. Unele sînt de natură complexă (acizi grași, sfingozină, hidrați de carbon pentru sistemul heterofil ale cărui antigene au fost detectate prin antiseruri specifice). Multe dintre ele sînt însă glicoproteine (sistemele M, N, S, d, A_1, A_2, O, Rh, Lutheran).

Suprafață predominant antigenică se găsește și la celulele nucleate ale mamiferelor la care nu se constată o specificitate de țesut, dar care au în schimb o mare specificitate de specie. Antigenele membranare limfocitare ajunse în specii străine au proprietăți imunosupresive sau nefrotoxice. Acest lucru se demonstrează astfel : se produce antiser de iepure prin imunizare cu creier de șobolan sau celule epiteliale în cultură. După injectarea acestui antiser la șobolan, se constată o creștere de la 20 la 150 mg/zi a proteinuriei șobolanilor. După 2 ore de la injecție, secțiunile din rinichi colorate cu antiser cuplat cu o substanță fluorescentă prezintă localizarea gamaglobulinei șobolanului în glomerulul lui Malpighi din rinichi. După 8 zile de la injecție, celulele mezangiului și a endoteliului glomerular sînt mult mărite și proliferează. Dar. sînt și anticorpi umorali de transplantare care se combină cu antigenele membranare determinînd rejecția hiperacută a unui rinichi grefat. Astfel, majoritatea persoanelor la care se transplantează homografe renale formează anticorpi iar aceștia sînt absorbiți de grefonul renal în cîteva săptămîni. Insă sînt și cazuri cînd grefonul este rejetat la cîteva ore, datorită sensibilizării anterioare, ceea ce determină o acumulare de anticorpi consi-

Scanned with OKEN Scanner

derabilă. În plus, celula mamiferelor poartă pe membrana ei situsuri și antigenice de transplantare care reacționează cu anticorpii respectivi, ca și atunci cînd celula ar ajunge să trăiască într-un mediu străin.

1.4.7. ROLUL PLASMALEMEI ÎN MORFOGENEZĂ

L. Wolpert și T. Gustafson, studiind embriogeneza echinodermelor, au descoperit o serie de fenomene de membrană implicate în mișcările morfogenetice. Astfel, la blastulele avansate, circa 40 celule mezenhimale ale polului vegetativ încep o activitate pulsatilă, își pierd aderența de macromerele endodermice și de membrana hialină care învelește embrionul și ajung libere în blastocel. Aci ele emit pseudopode lungi și subțiri care, dacă nu vin în contact cu vreun substrat, se retractă. Însă, cum aceste micromere mezenhimale se ating unele de altele în blastocel, ele se asamblează prin pseudopode într-un fel de cablu de care „atîrnă" corpul celulelor. În acest timp, pseudopodele se pot prinde *numai* de limitele dintre blastomerele ectodermice față de care prezintă un maximum de adezivitate. Acest maximum de adezivitate se stabilește într-un anumit interval de timp și el se manifestă astfel numai în anumite regiuni ale feței interne de pe calota de blastomere ectodermice. De acea regiune va fi legat cablul mezenhimal scheletogen care va forma viitorul schelet al animalului. La 12 ore de la fecundație, blastomerele endodermice ale polului vegetativ încep și ele să devină pulsatile, se aglomerează și determină invaginarea endodermului. Endodermul invaginat constituie un tub „orb" la capăt, care străbate cam o treime din blastocel și marchează, astfel, perioada gastrulației. Apoi celulele din capătul orb al arhenteronului se fixează de peretele intern al embrionului și, contractîndu-se, trag în sus arhenteronul către polul animal. După aceea, aceste celule se desprind de arhenteron și cad libere în blastocel.

Curbarea intestinului determină atingerea capătului său de regiunea ventrală, unde se va deschide orificiul bucal. În același timp, celulele arhenterice de pe laturile tubului digestiv emit pseudopode care le deplasează și determină apariția a două vezicule celomice. Deci, prima parte a gastrulației se realizează prin pierderea contactului dintre celulele polului vegetativ cu formarea mezenhimului scheletogen și arhenteronului, iar în faza a doua, prin contracția pseudopodelor celulelor anterolaterale ale tubului arhenteric, iau naștere veziculele celomice. Energia necesară contracției pseudopodelor este de 10^{-4} erg., deci destul de slabă. Ca o compensație a acestui fapt apare *paralizia de contact,* un fenomen de membrană care modelează mișcările morfogenetice. Cînd un pseudopod care se alungește vine în contact cu o celulă, expansiunea pseudopodului încetează. Ectodermul are o foarte slabă motilitate „in situ" și, cu cît caracterul juxtapus este mai accentuat, cu atît activitatea pseudopodială este mai slabă. Cînd pseudopodul care se alungește vine în atingere cu un substrat de care aderă, atunci încetează expansiunea sa și pseudopodul se contractă trăgînd după el corpul celulei. Această paralizie de contact, împreună cu proprietățile mecanice, forma și polaritatea celulei, determină o *inhibiție de contact.* Astfel fibroblaștii, care emit pseudopozi

Scanned with OKEN Scanner

numai în regiunea membranei ondulate, cînd întîlnesc altă celulă manifestă un grad atît de mare de contact încît îi împiedică să treacă peste celula ieşită în cale. Aşa se explică de ce fibroblaştii nu se încrucişează deloc.

Mişcările morfogenetice au fost analizate şi în neurulaţia amfibienilor unde ele duc la închiderea şanţului neural şi formarea tubului neural. Mercaptoetanolul şi acidul lipoic împiedică închiderea şanţului neural aşa că placa neurală rămîne întinsă, fără ca restul morfogenezei să fie afectat. Şi invers, adaosul de ATP accelerează formarea tubului nervos care se realizează în cîteva ore. Mercaptoetanolul stimulează „in vivo" sinteza ADN şi ARN, dar inhibă metilarea *t*-ARN şi provoacă producerea unor proteine anormale prin reducerea punţilor — SS — sau formarea unor disulfuri mixte. El mai acţionează asupra proteinelor contractile corticale ale celulelor. Se ştie că în cortexul oocitelor există proteine sulfhidrilice care se contractă în prezenţa ATP şi sînt asemănătoare actinei şi miozinei musculare.

Închiderea sistemului nervos este însoţită de unele deformări ale celulelor neuroectodermice care se alungesc, contractîndu-se la extremitatea distală ; din sferice devin trapezoidale. Ori asemenea deformări celulare sînt absolut necesare în neurulaţie. Tratarea embrionilor cu vimblastină şi colchicină inhibă formarea microtubulilor şi opreşte alungirea celulelor. Contracţia apicală a celulelor se datoreşte unui inel contractil de microfilamente de actină. În orice caz, asamblarea microtubulilor şi microfilamentelor este sub controlul *c*-AMP a cărui concentraţie este mare în celulele embrionare care migrează activ. Citochalazina B inhibă asamblarea microfilamentelor dar provoacă şi disocierea embrionilor în celule izolate.

După formarea tubului neural, crestele neurale de pe partea dorsală şi mediană a lui conţin o populaţie de celule care va migra în restul embrionului. Din 1868 şi pînă în prezent s-a dovedit că din celulele migrate din aceste creste neurale iau naştere : craniul cartilaginos (neurocraniul) şi splanchnocraniul, în afară de bazibrahial, ectomezenhimul cefalic al craniului, partea ventrală a prozencefalului, celulele pigmentare ale capului, pulpa dentară şi odontoblaştii ; participă la formarea ganglionilor cranieni, ganglionilor rahidieni simpatici, sistemului cromafin, celulelor lui R o h on — B é a r d, diverselor celule asociate sistemului nervos, epidermului dorsal şi mezenhimului înotătoarei dorsale a vertebratelor acvatice, celulelor pigmentare troncale, celulelor C (cu calcitonină) ale tiroidei şi paratiroidei, celulelor cu ACTH şi MSH din adenohipofiză, celulelor glandulare din corpii ultimobranhiali, celulelor cu amine fluorigene din glomusul carotidian, celulelor pereţilor arcului aortic, celulelor cromafine din intestin.

Această uriaşă gamă a diferenţierilor celulelor crestelor neurale se face în urma migraţiei lor, şi experimental s-a putut dovedi aceasta. Celulele migrează pe căile care le sînt „impuse" de condiţiile anatomice înconjurătoare ; ele găsesc în jurul lor tot felul de structuri care le favorizează sau nu deplasarea.

Scanned with OKEN Scanner

Adeziunea celulelor la substrat, care este o condiție a motilității lor, depinde de acidul hialuronic și sărurile acestuia, care o stimulează și întîrzie diferențierea. La fel colagenul și sulfatul de condroitină constituie suporturi de migrări masive. Și invers, factorul creșterii nervoase favorizează agregarea celulară și neurogeneza, inhibînd dispersia. Dispersia celulară ajută pigmentogeneza. Se pare că pentru fiecare regiune a corpului embrionului sînt căi specifice de migrare a celulelor crestelor neurale care, la începutul deplasărilor, sînt pluripotente. Motilitatea este condiționată de diferiți factori locali ai spațiilor pe care le străbat. Dar totuși trebuie avut în considerație și *informația pozițională* prin care celulele „recunosc" locul unde se vor opri, adică ținta finală.

Diferențierea celulelor se face fie de la început pentru celulele pigmentare, fie prin interacțiunile cu diferite țesuturi pe parcursul căii străbătute, sau la „organul țintă" sub acțiunile unor substraturi inductoare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

HIALOPLASMA

Hialoplasma este mediul intern al celulei, compartimentat de sistemul de endomembrane şi limitat la exterior de plasmalemă.

2.1. STRUCTURĂ ŞI ULTRASTRUCTURĂ

Izolarea hialoplasmei în stare pură este o operaţiune plină de impedimente datorită „contaminării" ei cu diferiţii constituenţi celulari. Văzută la microscopul fotonic, hialoplasma apare, aşa cum bine a descris-o F. Dujardin,... „perfect omogenă, elastică şi contractilă, diafană şi reflectînd lumina puţin mai mult ca apa şi mult mai puţin ca uleiul." La microscopul cu fond întunecat apare optic vidă, cu toate că sub diferitele influenţe externe are o rigiditate sau fluiditate variabilă, după zonele examinate şi momentele date.

Considerată ca un sistem heterogen al unui hidrogel de tip coloid-emulsoid, hialoplasma poate flocula devenind oplascentă sau coagula ireversibil, transformîndu-se într-o masă spongioasă, strălucitoare. Poate să se îmbibe foarte mult cu apă şi această capacitate devine minimă la *p*Hi [1] al proteinelor constituente. Are o viscozitate foarte variabilă, de 3—10 000 ori mai mare ca apa. La *p*Hi al proteinelor, viscozitatea devine minimă. Rigiditatea hialoplasmei este variabilă, în unele celule prezentînd o adevărată tixotropie, manifestată prin trecerea bruscă dintr-o stare rigidă într-una fluidă. Dacă se taie o celulă sub apă, hialoplasma se desface în sfere mici de coacervate, în jurul cărora se constituie o membrană. Asemenea sistem heterogen de hidrogel în echilibru este înconjurat de filme mono- sau bimoleculare fosfolipidice. Datorită diferitelor grupări active ale acestor filme — interfeţe orientate totdeauna de aceeaşi parte — iau naştere forţe electrostatice. Interfeţele devin polarizate, suprafaţa avînd o sarcină iar interiorul alta. Este cunoscut că plasmalema la suprafaţă este + iar în interior este —. Încărcătura electrică internă a citoplasmei este şi ea o constantă celulară.

Celula asigură, în cadrul metabolismului său, un *p*H constant : ouăle de echinoderme au un *p*H = 5,8, fibrocitele de pui — *p*H = 6, pancreasul exocrin — *p*H = 6, hepatocitul — *p*H = 6 2, endoteliul — *p*H = 6,4, fibra musculară striată — *p*H = 5,8—6,7, amibele — *p*H = 6,8—7,8 etc.

[1] *pHi = punct izoelectric : p*H-ul la care proteinele de exemplu sînt fără încărcătură electrică şi la care prezintă o stabilitate minimă.

În hialoplasma multor celule se află granule de glicogen și galactogen, iar în cazurile unei diferențieri : microtubuli, neurofilamente, plasmafilamente, tonofilament și miofilamente.

2.1.1. MICROTUBULII

Au fost descoperiți pe secțiuni ultrafine la microscopul electronic de către D. Slautterback (1963), independent de M. Ledbetter și K. Porter (1963). Au un diametru de 200—250 Å și o grosime a peretelui de 50—80 Å și pot ajunge pînă la foarte mulți Å lungime. Datorită dimensiunilor lor pot fi văzuți și la microscopul fotonic cînd constituie fusul acromatic mitotic, care este birefringent în lumina polarizată. Birefringența pozitivă a fusului este mai mare la preparatele proaspete și hidratate decît la cele deshidratate și montate în balsam. Anizotropia optică + este în acest caz produsă de microtubulii anizodiametrici, dispuși paralel în fusul mitotic. Scăderea mare a birefringenței fusului în balsam se datorește asemănării de refracție ($n = 1{,}54$) al acestuia cu acela al proteinelor fusoriale, în așa fel încît birefringența fusului este mai mult un efect al orientării fibrelor sale decît al orientării moleculare intrinseci. Birefringența intrinsecă, datorită structurii în rețea a moleculelor, este anulată de prezența subunităților fibrilare, așa cum a demonstrat H. Sato (1970). Lipsa acestei birefringențe intrinsece se datorește faptului că peretele microtubular nu este format din lanțuri drepte de molecule ci din proteine globulare de 45 Å Ø, în număr de 13 particule pe secțiune transversală. Dispoziția acestor particule este helicoidală, cu un unghi de înclinare a helixului față de axul tubular de 80°, în cazul microtubulilor de la drojdii. Este de semnalat că în aceeași celulă a drojdiilor coexistă microtubuli de diferite grosimi (210, 225, 250 Å), toți compuși din unități globulare de 80 Å Ø, dispuse cîte 5, 6 și 7 pe fiecare tur al helixului. Fiecare particulă de 80 Å Ø se poate divide în 2 subunități de 40Å, astfel că în loc să fie un tur de 5, 6 și 7, sînt cîte două rînduri de 10, 12 și 14 subunități la un tur. În axonema heliozoarelor sînt microtubuli formați din 13 șiruri de unități a 40 Å Ø, fără o structură helicoidală. Dacă la temperatura normală au 22 Å Ø și sînt așezați regulat, la scăderea temperaturii se îngroașă la 34 Å Ø, dispunîndu-se neregulat.

Neurotubulii au un unghi al helixului de 10° și sînt formați din asocierea unor filamente de 90 Å Ø, compuse la rîndul lor dintr-o pereche de unități de 45 Å Ø. La desmidiaceul *Micrasterias denticulata*, O. Kiermayer a descris punți de 170 Å lungime între microtubulii citoplasmei corticale.

D. Renaud (1968) a stabilit că proteinele microtubulare au G. M. = 55 000 ± 5 000 și un coeficient de sedimentare de 6S. Proteina apare ca un dimer de 45 Å, cu o compoziție în aminoacizi asemănătoare cu miozina. Tubulina se leagă prin guanozintrifosfat formînd microtubuli. O particularitate a microtubulilor este adăugarea neîncetată a unităților proteice și a pierderii lor la capete, precum și o activitate ATP-azică. Proteinele tubulare ale fusului mitotic se combină cu colchicina, pentru care

Scanned with OKEN Scanner

au mare afinitate și fusul se dezorganizează. Temperaturile scăzute, ca și presiunile hidrostatice crescute fac să dispară microtubulii. Microtubulii ciliari rezistă însă la agenții de mai sus.

Se disting în general patru clase de microtubuli, după sensibilitatea la digestia enzimatică : un tip la heliozoare (220 și 340 Å), al doilea la drojdie (210, 225, 525 Å), al treilea la fusul mitotic (150 Å) și al patrulea în citoplasmă (250 Å). La flagelate sînt 9 tipuri de microtubuli (trei tipuri pentru corpusculul bazal, două pentru fibrilele periferice ale flagelului, 2 pentru cele centrale, unul pentru vîrful lui și altul pentru suprafață). În orice caz, subunitățile de 45 Å există în citoplasmă și se asamblează în microtubuli cu ajutorul energiei dată de GTP. Globulele proteice au cîte două legături polare prin care se reunesc în helix și porțiuni laterale cu care se dispun după generatoarea unui cilindru.

Există o genă pentru tubulină (cum se numește proteina microtubulilor), care produce *m*-ARN pentru tubulină. Acest mesager contribuie, în citoplasmă, la sinteza tubulinei. Colchicina împiedică polimerizarea tubulinei „in vitro". Trebuie menționată și „proteina floemului" găsită în vasele ciuruite de la plante. Tubulii acestor celule sînt de 230 Å Ø la *Nicotiana* și de 180—230 Å Ø la *Cucurbita* și au un perete gros de 60—70 Å, format din 6 unități. Odată cu diferențierea vaselor ciuruite, acești microtubuli dau naștere la niște filamente striate cu o periodicitate de 70 Å Ø.

Funcțiunile microtubulilor sînt multiple : de *translocare a cromozomilor*, de *susținere* (citoschelet) dar și cu rol *în motilitatea și în morfogeneza celulară*.

S. Inoué și H. Sato (1967) au arătat că microtubulii reprezintă elementele subcelulare ale fusului de diviziune de care sînt atașați centrozomii și cromozomii. În cursul meta- și anafazei microtubulii fusoriali se scurtează, dar grosimea fusului nu se schimbă. Această scurtare a tubulilor se face prin dezorganizarea lor la polii fusului în cursul migrației spre poli a cromozomilor. Particulele microtubulare desprinse din fibrele fusoriale vor reconstitui stocul de proteine tubulare dizolvate ce vor folosi la formarea unor microtubuli noi. Microtubulii fragmoplastului celulelor vegetale direcționează pe de altă parte mișcarea veziculelor golgiene către planul ecuatorial. În timpul mitozei microtubulii produc vehicularea veziculelor golgiene spre placa (ecuatorială) celulară și în spațiul periplasmatic, în timp ce alte vezicule migrează de la poli către regiunea ecuatorială, de-a lungul tubulilor polari. La fel și granulele de melanină ale melanoforilor de la pești migrează de-a lungul microtubulilor din citoplasmă. Funcția lor de translocație este mai mult pasivă, determinînd direcția mișcării și „alinierea" diferitelor structuri morfologice intracelulare. În axopodele acinețienior și heliozoarelor găsim sute de microtubuli uniți lateral prin punți de 70 Å care organizează dispunerea șirurilor de microtubuli într-o spirală, și alte punți de 20 Å care distanțează cele 12 ture ale decagonului (văzut în secțiune transversală) de microtubuli.

Sistemul de microtubuli din blastomerele echinodermelor determină asimetria gastrulei, așa că la un tratament cu colchicină larvele devin sferice. Sistemul de microtubuli poate fi stabilizat cu D_2O.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru K. Porter şi L. Tilney microtubulii sînt elemente citoscheletice elastice, iar energia eliberată de ei la suprafaţă este tradusă în mişcări citoplasmatice. Şi aceasta se vede cel mai bine în cazul flagelilor ale căror fibrile (9 + 2) sînt formate din tubulină foarte asemănătoare actinei. Este foarte adevărat că o contracţie a microtubulilor izolaţi „in vitro" n-a putut fi observată decît în cazul unor cozi de spermatozoizi, în prezenţa ATP. Dar, de regulă, se poate face o legătură între celulele foarte mobile şi bogăţia în microtubuli. În spermatozoidul de la *Equisetum* corpusculul bazal al aparatului locomotor multiflagelar este dispus de-a lungul unui strat lung de microtubuli paraleli.

2.1.2. PLASMAFILAMENTELE

Plasmafilamentele mixomicetului *Phyarum,* care se găsesc şi în citoplasma amibelor, au un diametru de 80 Å, în loc de 240 Å cît au microtubulii. A. Allison (1971) a descoperit că extractele cu glicerol ale citoplasmei corticale a multor celule sînt foarte bogate în plasmafilamente. Ele se adună mai ales în jurul veziculelor endocitare şi sînt implicate în mişcările de contracţie şi chiar în alunecarea celulelor pe substrat.

Prezenţa microtubulilor în citoplasma corticală sugerează un rol preponderent privind forma celulelor. La celulele care se divid, există un inel de microtubuli la periferia ecuatorului fusului. Direcţia acestor microtubuli coincide, la celulele vegetale, cu a fibrelor de celuloză care se sintetizează în matricea pericelulară a peretelui celular de partea externă a plasmalemei. Microtubulii reprezintă o arhitectonică pentru materialul amorf al matricei peretelui celular, care asigură tocmai forma celulei. În unele cazuri, de exemplu în celulele conjunctive de la *Lymnea,* microtubulii iau naştere în cisternele reticulului endoplasmatic, dar în alte cazuri aceştia iau naştere direct în hialoplasmă.

2.1.3. MIOFILAMENTELE

Sînt printre cele mai importante structuri ale celulelor, fiind specializate în modificarea formei celulelor şi producerii unui lucru mecanic. După cum este cunoscut din experienţele lui H. Huxley, miofibrilele celulelor musculare striate sînt compuse din miofilamente groase (de 100 Å Ø) de *miozină* şi miofilamente subţiri (de 50 Å Ø) de *actină.* Miofilamentele de miozină se întind de-a lungul unei benzi *A,* iar cele de actină de o parte şi de alta a striei Z. Stria Z corespunde unei zone unde filamentele subţiri ale sarcomerelor vecine se anastomozează între ele. Banda *I* este formată numai din filamente subţiri, iar banda *A* din filamente groase între care se află filamente subţiri. Acestea din urmă nu merg însă pînă la mijlocul benzii *A,* astfel că în centrul acesteia se găsesc numai filamente groase. Zona din banda *A* compusă din filamente groase corespunde benzii *H.* De regulă, la insecte şi la vertebrate în jurul unui filament gros se găsesc 6 filamente subţiri.

Actina constituie 25% din proteinele miofibrilare şi are o G.M. de 70 000. Ea se găseşte sub o formă globulară sau sub formă fibroasă, cînd

Scanned with OKEN Scanner

prezintă o lungime de 300 Å pe 25 Å Ø. Miozina reprezintă 55% din proteine, are o GM de 450 000, cu o moleculă de 1600 Å lungime pe 25 Å Ø. Prin hidroliză enzimatică se separă în *meromiozină* uşoară, cu GM 100 000 şi grea, cu GM 350 000.

Molecula de miozină are o mare afinitate pentru calciu. Pe de altă parte, s-a constatat că actina şi miozina purificate nu se pot combina într-un *complex actomiozinic* cum se întîmplă cu preparatele nepurificate. Formarea complexului este realizată de *tropomiozină* împreună cu *troponina*, care este sensibilă la o concentraţie de 10^4—10^6 M^{-1} Ca^{++}. Miozina este o proteină de structură cu proprietăţi enzimatice deoarece catalizează hidroliza ATP în ADP. Proprietatea ATP-azică o are numai meromiozina uşoară.

2.2. CONSTITUŢIA CHIMICĂ

2.2.1. STUDIUL „IN SITU"

O gamă largă de metode citochimice au pus în evidenţă în hialoplasmă o serie de compuşi organici şi minerali ca, de pildă, proteine simple, glicoproteine, lipoproteine, grupările — NH_2,—COOH,—SH, precum şi triptofan, arginină, indoli etc. S-au elaborat chei dicotomice pentru detectarea histochimică a lipidelor şi a polizaharidelor, iar metodele imunofluorescenţei oferă o precizie mult mai mare.

2.2.2. IZOLAREA ŞI EXTRACŢIA HIALOPLASMEI

Metoda ultracentrifugării diferenţiale prin care se izolează organitele subcelulare lasă la urmă o fază solubilă care conţine şi hialoplasma. Bineînţeles că această ultimă subfracţie nu este pură ci are o serie de „contaminări" provenite din organite. În privinţa unor constituenţi insolubili, filamente sau granule ale hialoplasmei, acestea se elimină prin sedimentare cu celelalte organite în timpul centrifugării. Cînd asemenea componente sînt în mare cantitate pot fi totuşi izolate, aşa cum este cazul glicogenului, lipidelor şi miofilamentelor. În plus, se mai pot studia elementele fibroase şi prin extracţii specifice cu diferite soluţii saline şi examinarea preparatelor la microscopul polarizant, aşa cum s-a procedat la analiza miofibrilelor.

2.2.3. ANALIZA CHIMICA

Analiza „fazei solubile" care conţine componentele hialoplasmei stabileşte în primul rînd conţinutul mare de apă (85%, după care urmează acela ale proteinelor şi aminoacizilor liberi. În plus, circa 15% din ARN-ul celular se află în această fază lichidă ca *m*-ARN şi *t*-ARN. S-au mai dozat şi glucide, produşi ai metabolismului intermediar, nucleozide, nucleotide şi săruri minerale. Componenta insolubilă este reprezentată prin proteine de structură fibroase, glicogen şi picături de lipide. Ori tocmai existenţa proteinelor globulare şi fibroase conferă hialoplasmei starea coloidală.

Scanned with OKEN Scanner

Macromoleculele proteice reprezintă faza dispersată a coloizilor hialoplasmatici, iar apa și micile molecule dizolvate faza de dispersie. Ansamblul macromolecular poate sta strîns solidarizat prin forțe mai mari, ceea ce-i conferă citoplasmei o viscozitate mare. O astfel de citoplasmă consistentă se numește *plasmagel*. Cînd forțele sînt mai slabe, coloidul citoplasmatic este mai fluid, adică un *plasmasol*. Cum forțele care acționează asupra macromoleculelor se schimbă neîncetat, hialoplasma trece, în întregime sau numai parțial, din sol în gel. Fenomenul fizic se numește *tixotropie*. S-au făcut încercări de a se clasifica componentele fazei solubile în :

1. *Micromolecule*, care sînt ioni anorganici de K^+, Na^+, Ca^{++}, Mg^{++} în apă, la un *p*H = 7. De reținut este faptul că $1\mu^3$ de hialoplasmă conține 60 ioni de hidrogen astfel că, dat fiind compartimentarea ei în celulă, probabil există și variații locale de *p*H.

2. *Mezomoleculele*, care sînt reprezentate prin nucleotide, intermediari ai metabolismului, zaharuri, aminoacizi, distribuite toate în mod egal în toate compartimentele celulare. Reținem numai faptul că există un stoc de aminoacizi celulari care se reînnoiesc neîncetat.

3. *Macromoleculele* sînt proteice, lipidice și lipoproteice, acizi nucleici. Ținem să subliniem faptul că hialoplasma conține un echipament enzimatic deosebit de bogat : enzimele care activează aminoacizii, enzimele sintezei acizilor nucleici, ale lipidelor, enzimele glicolizei, ale metabolismului glicogenului și ciclului oxidativ pentozofosfatic.

2.3. ROLURI ȘI ACTIVITĂȚI FIZIOLOGICE

2.3.1. ÎNTRETAIEREA DIFERITELOR CĂI METABOLICE

Hialoplasma este sediul căilor metabolice unde se desfășoară marea majoritate a reacțiilor biochimice. În plus de aceasta, ea este sediul activității constituenților celulari pe care-i aprovizionează cu substanțe necesare anabolismului și de la care primește produsele dezasimilației rezultate din catabolism. Hialoplasma este, deci, mediul intracelular în care se desfășoară principalele activități metabolice și unde energia chimică se transformă în energie mecanică, utilă mișcărilor celulare.

Punctul de plecare al multor căi metabolice din hialoplasmă este *glucozo-6-fosfatul* (G-6-P). Acesta este degradat în molecule mai mici cu producere de energie sau sînt sintetizate, plecînd de la el, alte molecule importante necesare metabolismului celular. G-6-P poate proveni fie direct din fosforilarea glucozei cu ajutorul ATP, fie indirect din glicogen prin fosforoliza care separă de glucoză un fosfat și apoi se izomerizează G-1-P în G-6-P. Degradarea G-6-P are loc tot în hialoplasmă pe *calea glicolizei* și prin aceea *a pentozelor*.

Glicoliza conduce la formarea acidului piruvic care mai departe duce, în cadrul fermentației anaerobe, la acid lactic și, în cadrul respirației mitocondriale, la CO_2 (fig. 39).

Fermentația se desfășoară printr-o serie de reacții care implică numeroși intermediari de tipul esterilor fosforici ($R\text{-}O\text{-}PO_3H_2$), iar calea de la glucoză pînă la acidul piruvic este comună tuturor categoriilor de fer-

Scanned with OKEN Scanner

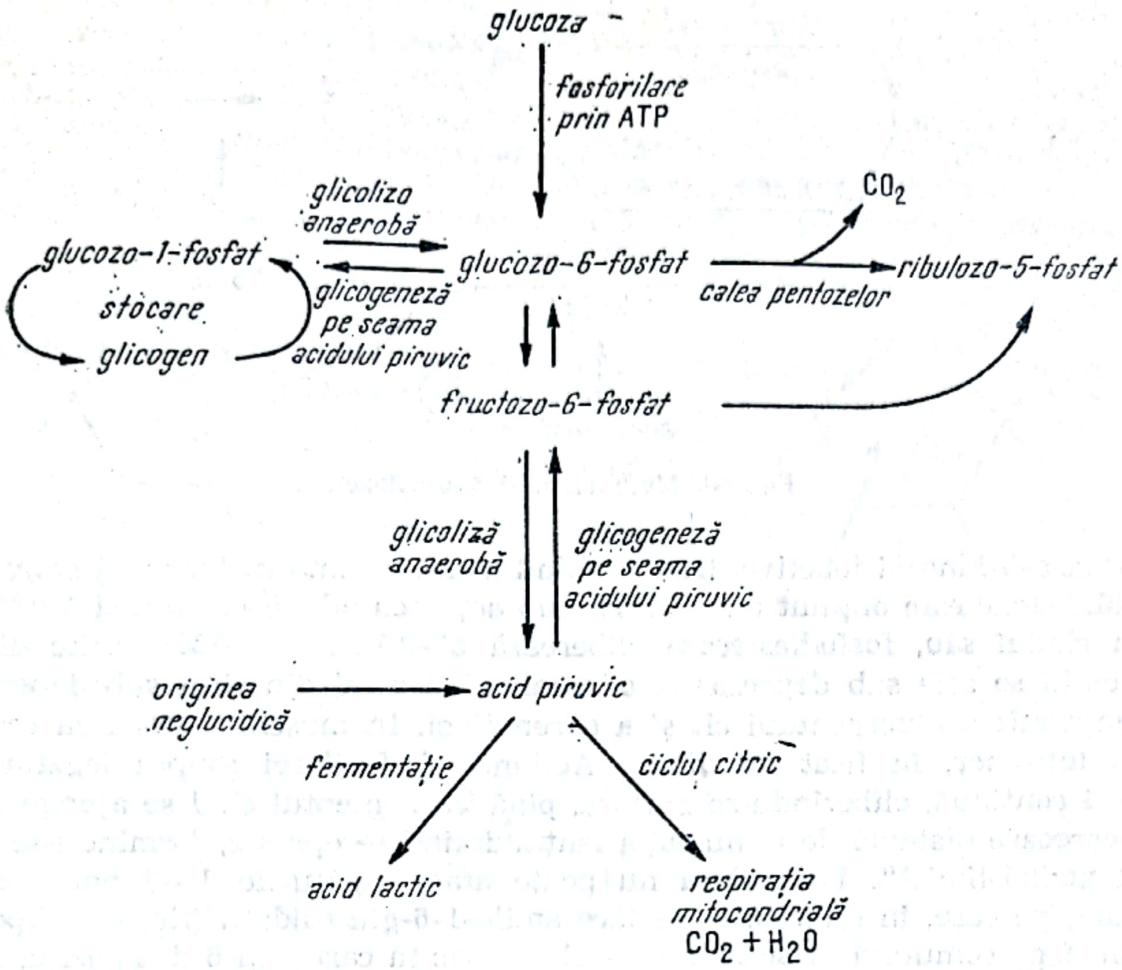


Fig. 39. Principalele căi metabolice care pornesc de la G-6-P. Toate, în afară de respirația mitocondrială, sînt anaerobe.

mentații. De la acidul piruvic la anumite produse terminale, procesele au loc după reacții specifice.

Glicogenoliza reprezintă o formă deosebită a degradării glucidelor la animale, unde glicogenul constituie o rezervă musculară și hepatică. Fosforilaza musculară desface moleculele de G-1-P din glicogen. Această enzimă este un tetramer format din 4 subunități identice, care conțin fiecare serină cu funcția alcool esterificată de PO_4H_3. De lizina ei se leagă fosfatul de piridoxal. Fosforilazo-fosfataza separă enzima tetrameră activă în doi dimeri inactivi. Forma inactivă musculară se transformă într-o formă activă în prezența ATP, sub acțiunea fosforilazo-*b*-kinazei (fig. 40). Fosforilaza *a*, activă, din ficat este transformată în fosforilază *b*, inactivă, de către fosfataza-fosforilazică *a*, specifică. Fosforilaza *b* hepatică, inactivă, este transformată în forma activă de către fosforilazo-*b*-kinaza în prezența a 4-ATP, prin fixarea a 4 molecule de PO_4H_3.

E. Sutherland, care a demonstrat aceasta, a mai constatat că fosforilazo-*b*-chinaza, ce se află și sub formă inactivă, se activează prin protein-kinază (fosforilazo-*b*-kinază, kinază), cu AMP-3′,5′ ciclic ca factor alosteric. Această protein-kinază fosforilează reziduul seril al fos-

Scanned with OKEN Scanner

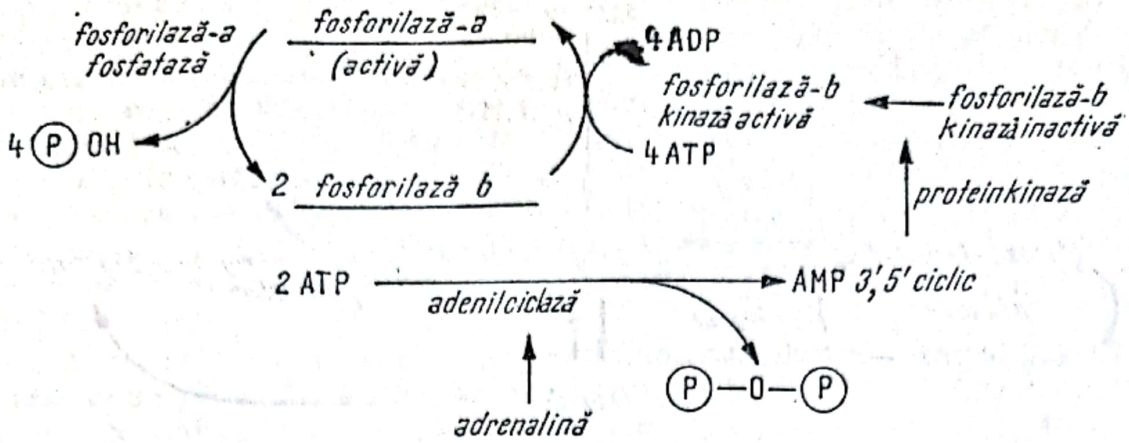


Fig. 40. Metabolismul fosforilazei.

forilazo-*b*-kinazei inactive, transformînd astfel enzima în forma ei activă. AMP ciclic este obţinut din 5'-ATP sub acţiunea adenil-ciclazei şi Mg^{++}. La rîndul său, fosfodiesteraza eliberează 5'-AMP. 3'5'-AMP ciclic din muşchi se află sub dependenţa adrenalinei, iar cel din ficat sub dependenţa atît a glucagonului cît şi a adrenalinei. În muşchi fosforilaza este un tetramer, în ficat un dimer. Acţiunea fosforilazei asupra legăturii 1—4 continuă, eliberîndu-se glucoza, pînă în momentul cînd se ajunge la o oarecare distanţă de ramificaţia lanţului cînd se opreşte, formîndu-se o „dextrină-limită". Fosforilaza nu poate ataca legăturile 1—6 nou formate, pe care, în schimb, le desface amilo-1-6-glucosidaza (fig. 41). Apoi o fosfoglucomutază plasează radicalul fosforic în carbonul 6 din poziţia 1, iar glucozo-6-fosfataza desface fosfatul eliberînd glucoza în afara celulei.

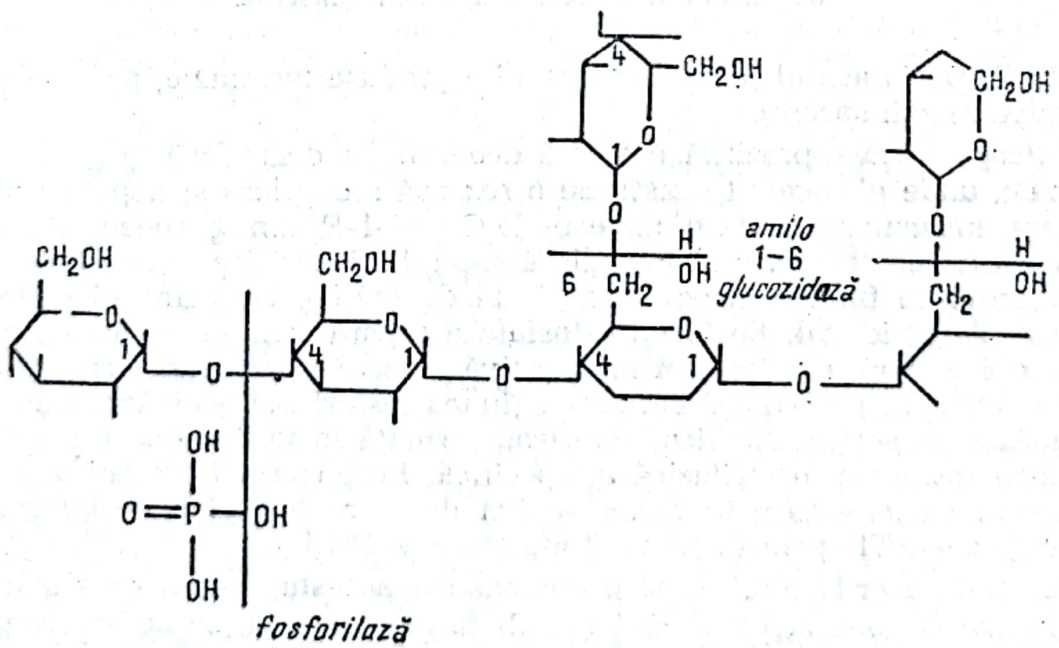


Fig. 41. Glicogen + *n* PO_4H_3 → dextrină limită ; dextrina limită → glicogen deramificat + glucoză.

Scanned with OKEN Scanner

În toate celulele se află o fosfohexo-izomerază. Ea transformă G-6-P în fructozo-6-fosfat care, în prezența ATP și a fosfo-fructokinazei, formează fructozo-1-6-difosfat. Fructozo-difosfatul se scindează grație catalizei aldolazei în două trioze : fosfodihidroxiacetonă și fosfogliceraldehidă care, sub acțiunea unei triozo-fosfat-izomerază, sînt în echilibru în favoarea primului (fig. 42). Apoi are loc, în patru etape, dehidrogenarea 3-fosfogliceraldehidei în acid 3-fosfogliceric prin intervenția fosfogliceraldehid-

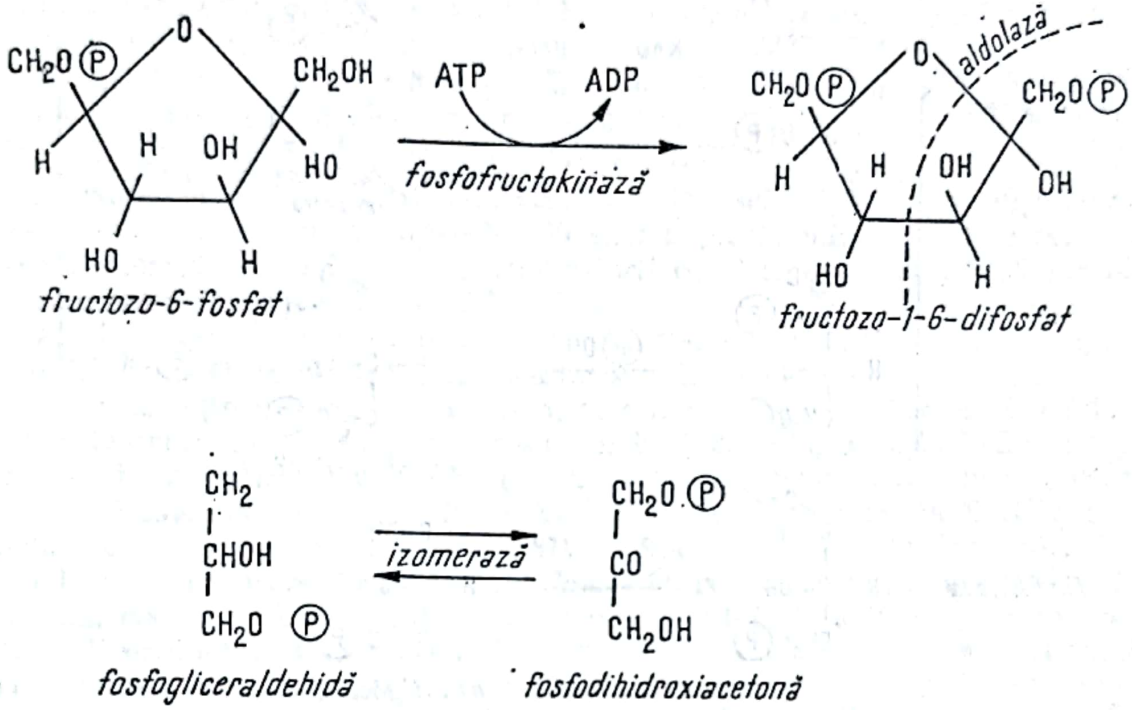


Fig. 42. Catabolismul glocozo-6-fosfatului pînă la fosfogliceraldehidă.

dehidrogenazei, care are un centru activ cu funcție tiol și drept coenzimă NAD. Enzima se notează prescurtat HSⒺ. Etapele sînt următoarele :

1. Combinarea substratului 3-fosfogliceraldehida cu enzima la nivelul funcției tiol a acesteia. Ia naștere o legătură săracă în energie — C-S —, care este inhibată de acidul monoiodacetic, datorită combinării lui cu — SH.

2. Combinarea menționată este dehidrogenată, reducîndu-se NAD și luînd naștere o legătură acilmercaptan bogată în energie.

3. Ionii fosfatici, eliberînd enzima, formează acidul difosfogliceric, cu o legătură acilfosfat bogată în energie.

4. O fosfokinază a acidului fosfogliceric transferă un ~ P la ADP și ia naștere ATP. În cadrul acestei fosforilări oxidative sinteza ATP este cuplată cu oxidarea fosfogliceraldehidei, concomitent cu reducerea NAD.

Apoi o mutază transportă fosfatul în moleculă, obținîndu-se acidul fosfo-2-gliceric, căruia enolaza îi ia o moleculă de apă, transformînd legătura esterică cu fosforul într-o legătură bogată în energie (fig. 43). Energia este apoi transferată cu fosfatul la ADP, care se transformă în „moneda de schimb energetic" — ATP.

Scanned with OKEN Scanner

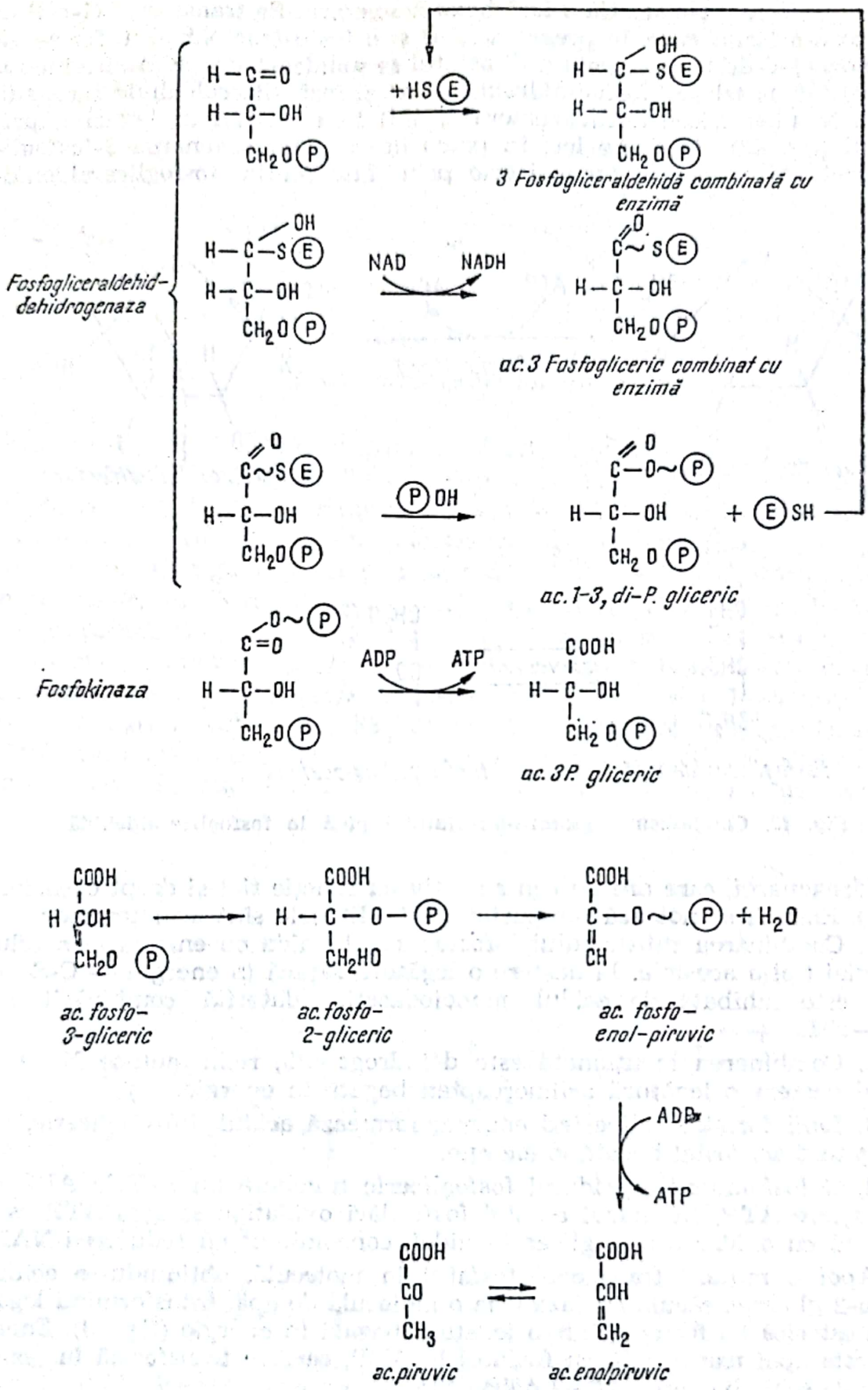


Fig. 43. Catabolismul glucozo-6-fosfatului de la fosfogliceraldehidă pînă la acidul 3-P-gliceric şi acid piruvic.

Acidul fosfoenolpiruvic este defosforilat în acid enolpiruvic de către kinaza acidului piruvic, iar acidul enolpiruvic se izomerizează spontan în acid piruvic. Pentru a se ajunge la esterul fructozodifosforic sînt necesare două molecule de ATP, cînd se pornește de la glucoză și una singură, cînd glucoza provine din glicogen. Transformarea glucozei în G-6-P necesită un ATP, iar transformarea F-6-P în F-1-6-P încă un ATP. În schimb, transformarea acestui ester în acid piruvic produce 2 ATP de trioză, deci 4 ATP, pentru că fiecare fructoză dă două trioze : în cazul reacției acidului-1-3-difosfogliceric → acid-3-P-gliceric, și în reacția acidului fosfoenolpiruvic → acid piruvic.

Bilanțul energetic este, deci :

— cu glucoză : 4 ATP — 2 ATP = 2 ATP ;

— cu glicogenul : 4 ATP — 1 ATP = 3 ATP.

Întrucît prin transformarea glucozei în acid lactic se eliberează 60 000 calorii, și cum 20 000—30 000 sînt reținute sub formă de energie liberă folosită în ATP (cam 10 000 calorii de ATP), înseamnă că randamentul energetic este de circa 30—50%.

Acidul piruvic va fi catalizat aerob printr-o decarboxilare oxidativă, iar anaerob prin fermentația lactică sau alcoolică.

În contracția musculară de pildă, acidul piruvic se transformă în acid lactic datorită lacticodehidrogenazei din hialoplasmă, avînd NADH drept coenzimă. La levuri acidul lactic este decarboxilat prin carboxilază, a cărei coenzimă este cocarboxilaza, în acetaldehidă care, în prezența NADH, este redusă de către alcool-dehidrogenaza, de asemenea hialoplasmatică, în alcool etilic. În prezența oxigenului, celulele retransformă acidul lactic în glucoză, ceea ce duce la o scădere a consumului de glucoză. De asemenea, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza din cadrul glicolizei necesită grupări — SH necesare activității. Or, aceste grupări sînt oxidate în condiții de aerobioză, ceea ce contribuie încă odată la inhibarea glicolizei. În aerobioză se formează ATP care inhibă fosfo-fructokinaza în cadrul glicolizei, în timp ce AMP și Po_4 care apar în anaerobioză activează fosfofructokinaza și, implicit, glicoliza.

În cadrul catabolismului aerob, CO_2 se poate fixa în celulele animale, la acidul piruvic, formîndu-se acid malic, iar la celulele procariote și la cele vegetale ia naștere acidul oxaloacetic. În aerobioză acidul piruvic se va mai decarboxila oxidativ, dar ca și în cazul fixării CO_2 el va fi ars în ciclul citric.

Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic se face mai întîi prin tiaminpirofosfat (TPP), cînd se obține un complex de acetaldehidă — TPP, care este oxidat de acidul lipoic. Rezultă acidul acetillipoic — TPP, apoi radicalul acetil părăsește acidul lipoic și se leagă de coenzima A (acetil-CoA) eliberîndu-se acidul lipoic sub forma sa redusă, care se reoxidează pe seama NAD (fig. 44).

Sinteza glicogenului, care are loc în hialoplasmă, se face în diferitele țesuturi pe seama glucozei sau a acidului piruvic. Glucoza pătrunde prin membrana celulară și, sub influența glucokinazei (hepatice) sau a hexokinazei de specificitate mai mică, dar răspîndită în numeroase tipuri de celule, se obține glucozo-6-fosfatul, un produs care rămîne în celulă, nefiind difuzibil. De la acesta se trece la glucozo-1-fosfat și apoi la glicogen.

Scanned with OKEN Scanner

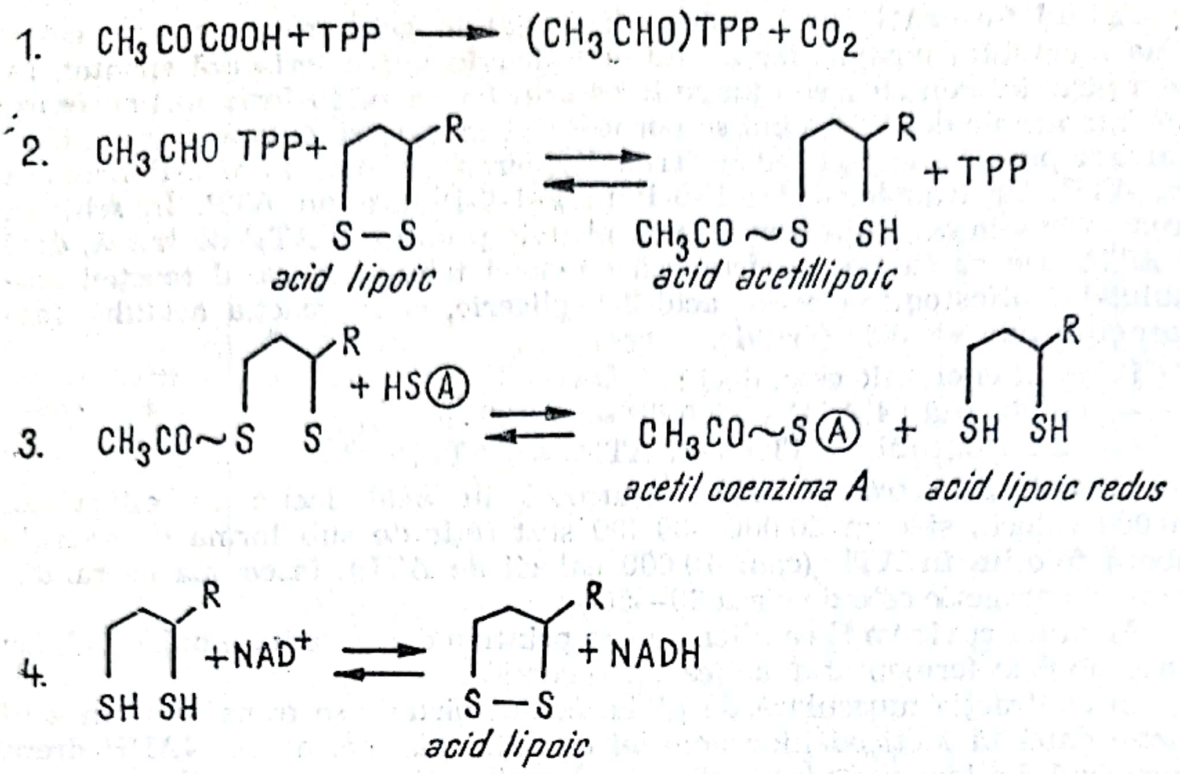

1. $CH_3COCOOH + TPP \longrightarrow (CH_3CHO)TPP + CO_2$
2. $CH_3CHO\ TPP +$ R S—S
acid lipoic
$\rightleftharpoons$ R $CH_3CO \sim S$ SH + TPP
acid acetillipoic
3. R $CH_3CO \sim S$ S + HSⒶ $\rightleftharpoons$ $CH_3CO \sim S$Ⓐ + R SH SH
acetil coenzima A
acid lipoic redus
4. R SH SH + NAD^+ $\rightleftharpoons$ R S—S + NADH
acid lipoic

Fig. 44. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic.

Pe seama acidului piruvic glicogeneza se desfășoară în sens invers glicolizei. La început CO_2 se fixează pe acidul piruvic datorită unei enzime, luînd naștere acid malic și reducîndu-se NADP. Acidul malic se reduce apoi în acid oxaloacetic prin malicodehidrogenază, a cărei coenzimă este NAD. Kinaza acid-fosfoenolpiruvică și guanozintrifosfatul (GTP) transformă acidul oxaloacetic în acid fosfoenolpiruvic, guanozindifosfat (GDP) și CO_2. Dar mai există și o altă cale directă prin care acidul piruvic se transformă în acid oxaloacetic datorită carboxikinazei piruvice, captării CO_2 și energiei ATP. Astfel, în mușchi, acțiunea acid piruvic-kinazei este reversibilă (fig. 45). Apoi reacțiile urmează cursul invers glicolizei pînă la fructozo-1-6 difosfat care, prin defosforilare cu fructozo-1-6 difosfatază, se transformă în fructozo-6-fosfat ș.a.m.d., pînă se ajunge la glucozo-1-fosfat care, în prezența uridintrifosfatului (UTP) și sub acțiunea unei UDPG-pirofosforilaze eliberează pirofosfatul (PP). UDPG-transfosforilaza sau glicogen-sintetaza din mușchi și grăsime, sensibilă la insulină, transferă glucoza pe un acceptor poliosidic 1—4, care se alungește (fig. 46).

Ramificarea lanțului are loc datorită amino- (1—4 → 1—6) transglucosidazei sau „enzima de ramificare". Fixarea radicalului glucosil pe lanțul glucan se efectuează sub acțiunea glucan-glucosil-transferazei, care eliberează UDP. UDP va da UTP prin hidroliza ATP. Transferaza (denumită UDPG-transfosforilază sau glicogen-sintetază) fixează un rest fosforilat și se transformă în fosfat-transferază (Tr. P) sub influența transfer-kinazei (Tr.). Tr. (*I*) este independentă de G-G-P dar Tr. P (*D*) este dependentă de G-6-P. Adenozin-monofosfatul ciclic este un activator al transfer-kinazei, care transformă deci Tr. (*I*), iar Tr. P (*D*) devine inactiv și scade glicogeneza. Insulina activează direct asupra Tr.-kinazei pe care

Scanned with OKEN Scanner

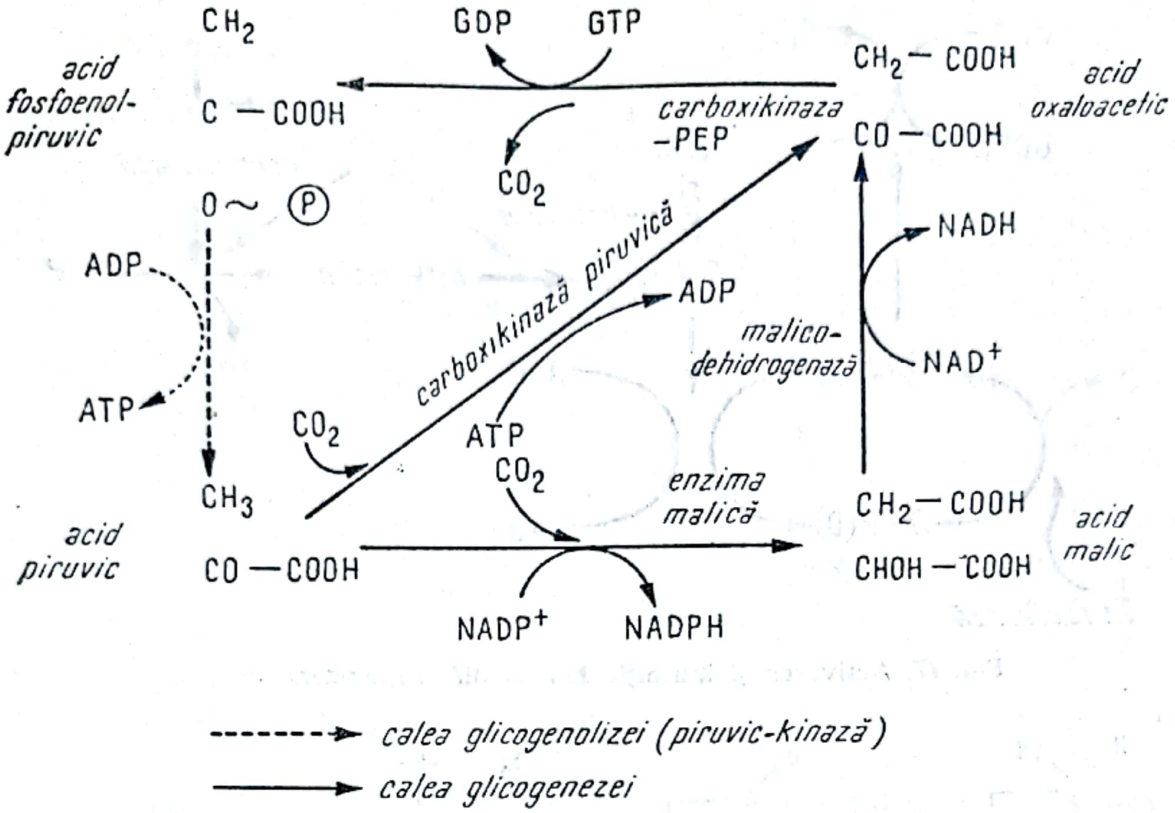


Fig. 45. Glicogeneza.

o inhibă accelerînd glicogenogeneza. Adrenalina activează adenil-ciclaza care provoacă formarea AMP ciclic și care, la rîndul său, activează Tr.- kinaza încetinind glicogeneza (fig. 47).

Glicogenul se poate sintetiza în ficat și pe seama altor zaharuri (fructoză, galactoză). De asemenea, aminoacizii pot da în cadrul catabolismului acid oxaloacetic sau acid piruvic. În faza de întuneric a fotosintezei, $6CO_2$ sînt reduse într-o moleculă de fructozo-6-fosfat care este izomerizat în glucozo-6-fosfat și mai departe stocat sub formă de amidon.

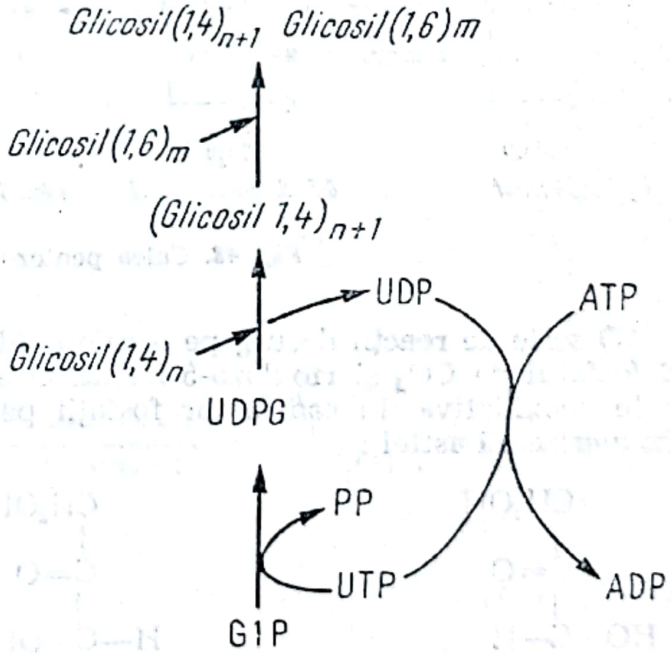


Fig. 46. Ramificarea lanțului glucan.

O altă cale este aceea a fosfaților pentozelor care joacă un rol important în folosirea și sinteza pentozelor, în degradarea glucozei ca și în sinteza NADPH (fig. 48).

Scanned with OKEN Scanner

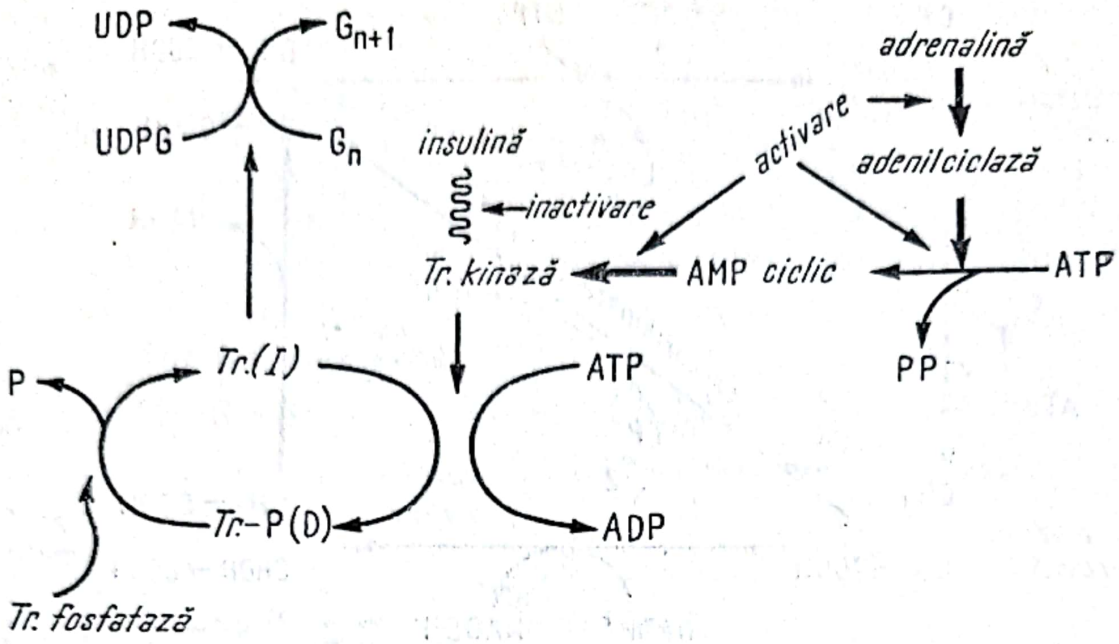


Fig. 47. Activarea şi inhibiţia hormonală a glicogenogenezei.

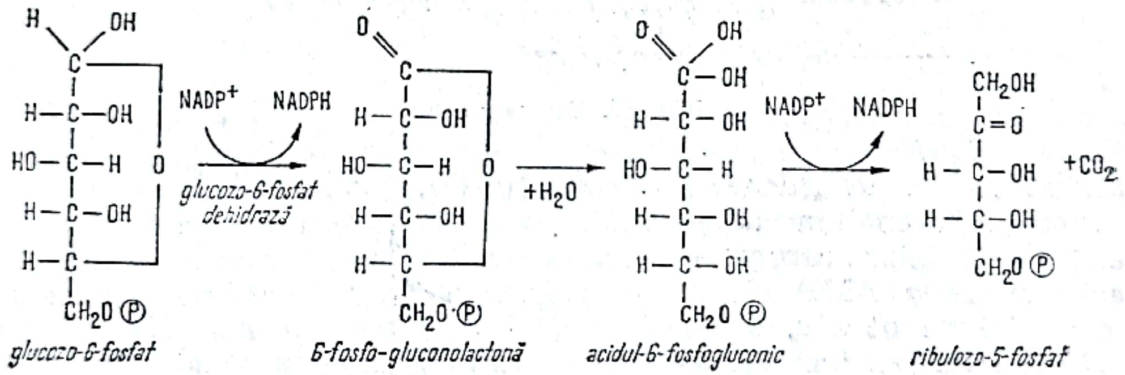
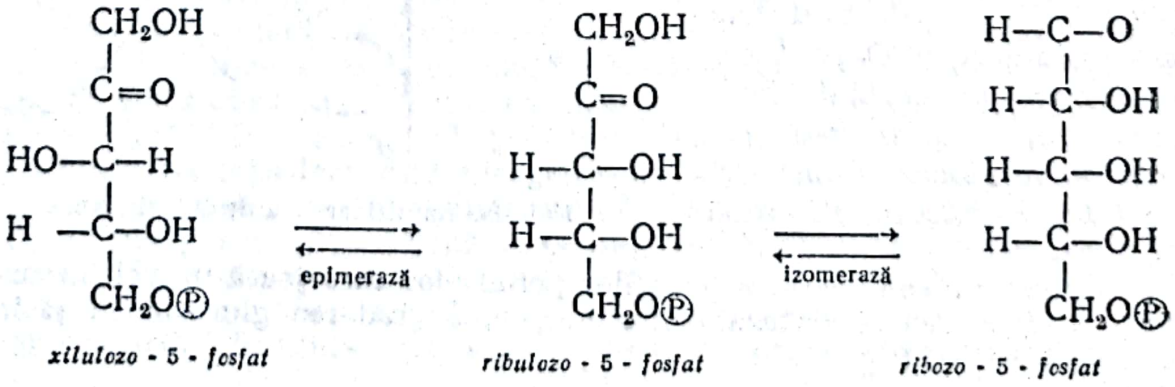
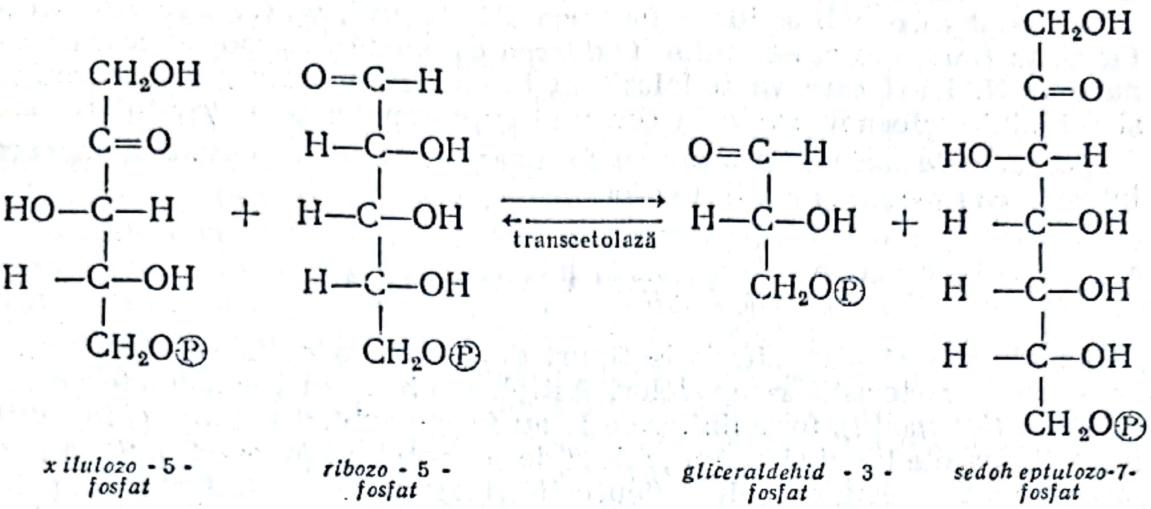


Fig. 48. Calea pentozofosfaţilor.

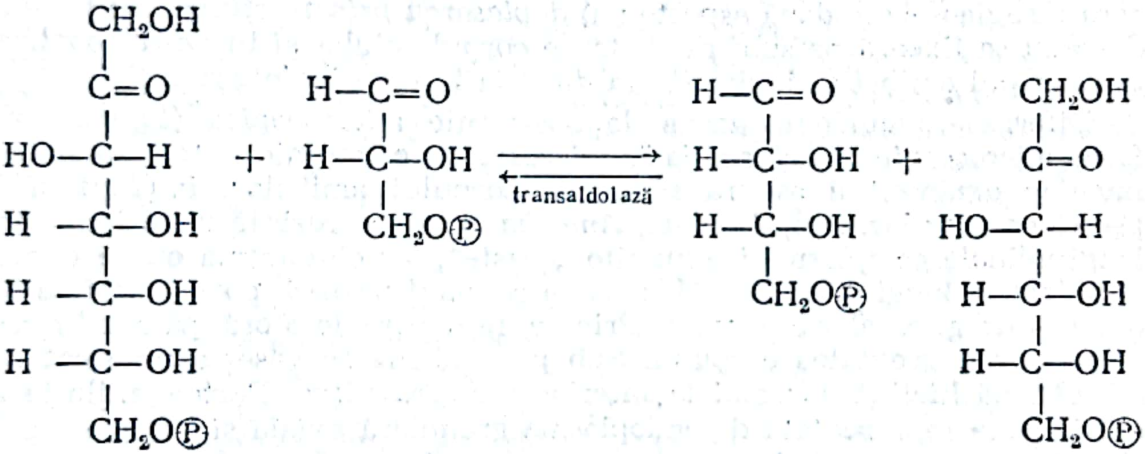
O serie de reacţii decurg pe o cale oxidativă în cadrul căreia glucozo-6-fosfatul dă CO_2 şi ribulozo-5-fosfat. O altă serie de reacţii urmează o cale neoxidativă. În cadrul lor fosfaţii pentozelor se epimerizează şi se izomerizează astfel :



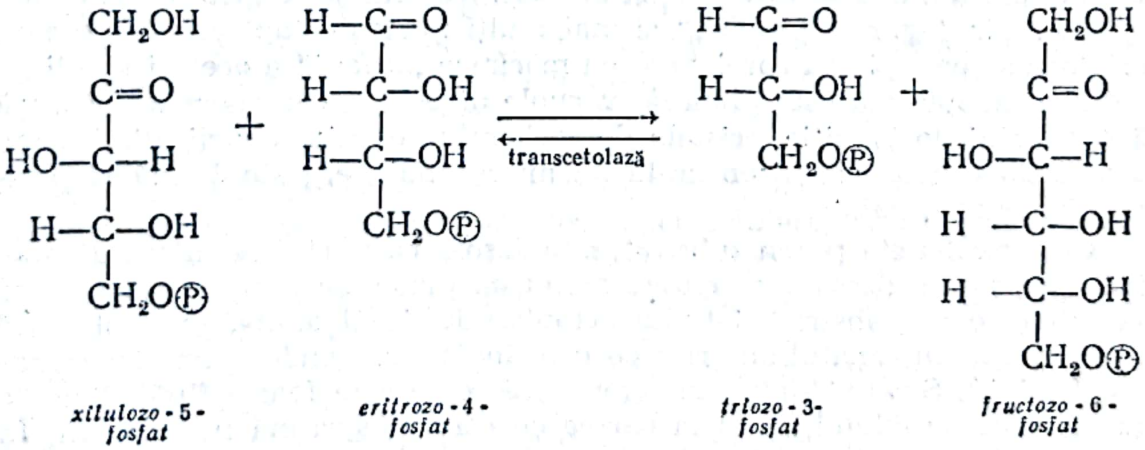
Apoi cele două pentoze își cedează reciproc o parte din molecula lor :



xilulozo - 5 - fosfat + *ribozo - 5 - fosfat* ⇄ *gliceraldehid - 3 - fosfat* + *sedoh eptulozo-7- fosfat*



sedoheptulozo -7- fosfat + *triozo - 3- fosfat* ⇄ *exitrozo - 4- fosfat* + *fructozo - 6- fosfat*



xilulozo - 5 - fosfat + *eritrozo - 4 - fosfat* ⇄ *triozo - 3- fosfat* + *fructozo - 6 - fosfat*

De-a lungul acestei căi neoxidative, trei molecule de fosfați ai pentozelor formează două molecule de fosfați de fructoză și un fosfat de trioză.

Scanned with OKEN Scanner

O aldolază leagă fosfatul de trioză de un alt fosfat de trioză (provenit din alte trei molecule de fosfaţi ai pentozelor) şi se formează un fructozo-1-6-difosfat care, sub acţiunea fructozo-difosfatazei, va da fructozo-6-fosfat şi, în final, glucozo-6-fosfat. Oxidarea completă a 1 mol. glucoză produce 12-NADPH care va fi folosit în biosinteza acizilor graşi, sterolilor şi acidului fosfoenolpiruvic în cortexul suprarenalei şi în ţesutul adipos.

La animale, acidul ascorbic se formează pe o cale deosebită, în care intervin ca precursori acizii uronici.

2.3.2. MIŞCAREA AMIBOIDALĂ

Se efectuează prin diferitele tipuri de pseudopode. Acest fel de mişcare este caracteristic rizopodelor. Astfel, amibele au pseudopode groase şi lobate *(lobopodii)*, foraminiferele le au foarte subţiri şi lungi *(filopodii)*, iar heliozoarele lungi şi cu un „miez" de microtubuli *(axopodii)*. Şi la metazoare sînt o serie de celule (leucocite, blastomere, celule parenhimale, mezenhimale etc.) care se deplasează prin mişcări amiboidale, în cadrul cărora se deosebesc două aspecte : a) *deplasarea prin tracţiune*, cînd pseudopodul se fixează pe substrat şi trage corpul celular şi b) *de rostogolire*, cînd corpul amibei se învîrteşte în direcţia în care înaintează.

Diferitele metode moderne de observaţie microscopică (contrast de fază, microscopie interferenţială, microscopie electronică etc.) au dat o imagine amănunţită asupra structurii corpului amibelor, implicit şi a pseudopodelor lor. Aşa, de pildă, *Amoeba proteus* prezintă nişte îngroşări longitudinale ectoplasmatice numite „coaste", iar citoplasma emite cîteva pseudopode lungi şi groase. Membrana celulară, groasă, poartă pe faţa sa externă un glicocalix antenular. Prin ea, în decurs de o oră, pătrund circa 4% apă din greutatea corpului. Sub plasmalemă se găseşte un strat de ectoplasmă hialină, iar mai la interior una granulară. Partea mijlocie a celulei este reprezentată de endoplasma granulară axială şi ea este separată de endoplasma de la exterior prin *„zona în foarfece"*. În partea anterioară ectoplasma granulară are o *„zonă în fîntînă"*, iar la partea posterioară o *„zonă de refacere"* şi *uroidul*. Nucleul are o membrană caracteristică „în fagure de albină" şi mai mulţi nucleoli, fapt care sugerează originea sa endoploidă corelată şi cu mărimea „uriaşă" a acestei specii de amibe. Endoplasma este plină de vacuole digestive, care persistă şi după 3 săptămîni de inaniţie, cristale de carboniluree, mitocondrii, dictiozomi, o vacuolă contractilă înconjurată de microtubuli, ergastoplasmă şi plasmafilamente spiralate.

Cînd amiba stă pe un substrat, citoplasma periferică se mişcă dinapoi înainte pe faţa dorsală a celulei, avînd ca punct de sprijin plasmalema ventrală de pe substrat şi tubul ectoplasmic. Cînd amiba se deplasează liber în apă, în capătul anterior cu care înaintează endoplasma se scurge „în fîntînă". Stratul hialin de ectoplasmă, care este foarte fluid, lipseşte în regiunea uroidului, ca şi la partea cu care se sprijină pe substrat. În momentul emiterii pseudopodului, jumătatea anterioară a sa devine un gel tixotropic, iar cea posterioară are o regiune centrală mai fluidă şi una periferică, rigidă.

Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere biostructural, pseudopodul este, deci, un complex ale cărui stări se modifică în funcţie de timp şi de energia obţinută. Putem opri înaintarea unui pseudopod lung de 0,194 mm exercitînd asupra amibei o presiune de 56 × 103 dyne/cm^3. Endoplasma se revarsă înainte în tubul ectoplasmic şi, ajungînd la capătul anterior, se „răsfrînge în fîntînă", transformîndu-se brusc în ectoplasmă. În acelaşi timp, la partea posterioară, ectoplasma se transformă în endoplasmă ş.a.m.d.

Supunînd citoplasma pseudopodului unei presiuni, ea se lichefiază şi amiba devine sferică. Deoarece în ectoplasmă micile particule de carboniluree prezintă mişcări browniene, se presupune a fi un plasmasol fluid. Se admite chiar existenţa a două faze care realizează o structură spongioasă, cu un indice de refracţie mai mic ca restul citoplasmei şi care se insinuează prin regiunile endoplasmatice mai consistente. Particulele care sînt animate de mişcări browniene din faza fluidă prezintă şi anumite mişcări dirijate, care au loc atunci cînd ele se deplasează printre locurile cu o viscozitate mai mică dintr-un gel spongios. Că lucrurile stau astfel, o dovedeşte următoarea experienţă : cînd se cetrifughează o amibă, cristalele cad „sacadat", apoi se redistribuie în endoplasmă la o turaţie mică, de 170 g, tot datorită structurii sale eterogene. La o mare presiune, se distruge structura endoplasmei şi amiba moare. O amibă care a fagocitat o sferulă de aur coloidal de 26 μ, centrifugată încet, datorită biostructurii endoplasmei deplasează sferula discontinuu în corpul ei. Dacă se pune amiba în 0,02 M.KCl, atunci rizopodul devine sferic şi granula de aer cade liber, deoarece citoplasma s-a fluidificat şi şi-a pierdut biostructura. Introducerea amibelor în capilare le sileşte să emită un singur pseudopod şi acest fapt are drept urmare pierderea în scurt timp a capacităţii de mişcare a protozoarului.

R. Allen a fundamentat pe baza unor asemenea observaţii *teoria mişcării amiboidale,* în cadrul căreia caută în primul rînd să găsească locul de aplicare a forţei motrice prin care se declanşează mişcarea. Acest loc poate fi tot tubul ectoplasmic contractat, sau capătul anterior al tubului, care împinge endoplasma printr-o contracţie în regiunea „zonei în fîntînă" sau în regiunea posterioară a peretelui intern ectoplasmic, care împinge endoplasma înainte, sau între ecto- şi endoplasmă, amiba deplasîndu-se în direcţii contrare.

Nu trebuie trecută cu vederea nici *concepţia fibrilară a mişcării amiboidale,* care are ca argument observarea electronmicroscopică a plasmafilamentelor spirale, de 0,25—0,5 μ lungime şi 185—210 Å Ø. Ele sînt localizate în uroid, de-a lungul tubului ectoplasmic, sub plasmalemă şi îndreptate spre interior ca şi în capătul hialian al pseudopodului. Acest complex fibrilar contractil (actomiozinic), împreună cu ATP şi Ca^{++}, constituie un sistem mecanochimic al locomoţiei celulare, ATP fiind localizat în regiunea uroidului unde are loc contracţia iniţială.

Cercetările întreprinse pe *Trichamoeba villosa* confirmă această concepţie deoarece se observă bine diferitele aspecte ale locomoţiei. Amiba se prezintă sub patru forme : *a) forma clavată,* care înaintează cu 200 μ pe minut şi are o ectoplasmă clară care apare la capătul anterior ca o bandă rotundă şi hialină. Aceasta este semi-rigidă în timpul locomoţiei. Endoplasma granulară se rupe în partea anterioară a amibei ; *b) forma*

Scanned with OKEN Scanner

radială, care apare în culturi agitate sau în urma modificărilor chimice din mediul extern. Ea este, deci, „pelagică", are pseudopode conice, hialine și de diferite lungimi ; *c) forma discoidală,* care apare în culturi staționare, stă pe fundul apei și are pseudopode mici ; *d) forma alungită,* intermediară între forma discoidală și clavată, pe care o au amibele în nemișcare, cu ramificări dese și scurte care le deformează corpul ; apoi nu mai rămîne decît un pseudopod, celelalte dispărînd și amiba monopodială își recapătă forma clavată.

S-a constatat că viscozitatea aparentă a endoplasmei variază cu regiunea celulei în mișcare și se traduce prin transformări sol ⇌ gel. De asemenea, trebuie conceput tubul ectoplasmic ca formînd un tot din punct de vedere structural cu „miezul" endoplasmic (fig 26). Numai „zona în foarfecă" și endoplasma caudală sînt mai fluide.

Diferențele aparente de viscozitate, vizibile la microscop, nu reflectă însă și modificările reale ale consistenței gelului citoplasmic. Într-adevăr, exercitarea unei presiuni hidrostatice mai mari provoacă lichefierea citoplasmei, iar pseudopodele se umflă la capăt transformîndu-se în „sfere terminale". Solația citoplasmei, determinată de presiunea mare, este urmată de o deformare pasivă a citoplasmei de la capătul pseudopodelor, care iau o formă sferică datorită forțelor tensiunii superficiale. Dar, după ce amiba este eliberată de acțiunea presiunii hidrostatice, după 10—15 minute are loc o contracție decompresivă în timpul căreia citoplasma granulară se contractă depărtîndu-se de plasmalemă și iese din ea un lichid hialin care, mai tîrziu, reîmbibă citoplasma. Localizarea contracției are loc foarte clar în regiunea posterioară a ectoplasmei, mai precis în tubul ectoplasmic care se scurtează. În momentul scurtării are loc ieșirea unui lichid din citoplasma granulară în zona de curgere, pe sub plasmalema caudală și dorsală, înspre partea anterioară cu care avansează. În partea posterioară, are loc mai ales „împăturirea" moleculelor de actomiozină. Solația ectoplasmei în „zona de recrutare" este, după R. Allen, o „supraîmpăturire" a acelorași molecule proteice, așa încît legăturile lor care le țineau strînse în gelație se desfac și citoplasma se fluidifică.

Cînd moleculele „împăturite" migrează în partea anterioară a celulei se „despăturesc", refăcînd legăturile și citoplasma devine mai solidă. Această gelație se propagă pînă la tubul ectoplasmic. Despăturirea sau denaturarea proteinelor este concomitentă cu o absorbție crescută de coloranți vitali, dîndu-ne astfel seama de starea citoplasmei. Așa, de pildă, amiba absoarbe mai mult roșu neutru în tubul ectoplasmic, unde macromoleculele sînt „despăturite", adică denaturate. În schimb, elimină roșul neutru în regiunea caudală unde moleculele sînt „împăturite", adică native. Injecțiile cu 3% ATP în regiunea caudală a unei amibe determină o mobilitate crescută, deoarece favorizează contracția. Injecțiile în mijlocul celulei produc o efervescență, iar în partea anterioară ATP-ul blochează scurgerea citoplasmei. Deci, endoplasma nu este fluidă și nu curge în afara tubului ectoplasmic. Ea „țîșnește" cu linii de scurgere regulate îngroșînd citoplasma dintre „zona fîntînii" și ectoplasmă și, în același timp, scurtînd-o. Endoplasma axială este structuralizată și transmite tensiunea între marginea (cu care celula înaintează și care este relativ rigidă) tubului ectoplasmic și endoplasma axială necontractată. Apoi tubul ectoplasmic

Scanned with OKEN Scanner

se extinde înainte, numai dacă este alipit de substrat prin plasmalemă. Este foarte probabil că asemenea contracție se datorește „zonei în fîntînă".

În privința mișcărilor axopodiilor, lucrările lui L. Tilney și K. Porter arată clar rolul microtubulilor. Mijlocul axopodiilor este format din microtubuli cu un diametru de 220 Å, dispuși în două benzi răsucite una peste alta, care se întind de-a lungul axopodului. Prin scăderea temperaturii mediului, axopodele se retractă și microtubulii se dezorganizează formînd tubuli de 340 Å Ø. Se pierde astfel birefringența, datorită orientării paralele a microtubulilor dar, după o zi, tubuliii se reorientează paralel. Odată cu încălzirea apei reapar și microtubulii ; în axopode se refac axonemele constituite din benzi de microtubuli reorientați paralel.

2.3.3. CENTRIOLII

În 1877, Th. Eimer a observat că epiteliile cu cili au la baza acestora niște *corpusculi bazali,* iar în 1897 M. Webber, studiind dezvoltarea anterozoizilor de *Zamia,* descoperă *blefaroplaștii* de la baza flagelilor. În același timp (1896), Th. Boveri, descriind fecundația echinodermelor, numește *centrozom,* sau „centru celular", citoplasma hialină de la capetele fusului de diviziune. În ea se află cîte un corpuscul cromatic sau *centriol* pe care, în 1898, L. Hennegny și M. von Lenhossek îl identifică cu corpusculii bazali.

Studiile de microscopie electronică au evidențiat structura fibrilară a acestor constituenți citoplasmatici, precum și identitatea lor, în ce privește caracteristicile generale, la toate tipurile de celule.

În ceea ce privește terminologia folosită acum, pentru unii autori corpusculii de la baza flagelilor sînt denumiți *blefaroplaști,* iar cei de la baza cililor *cinetozomi,* termenul de „centriol" fiind rezervat corpusculilor fără vreun raport cu cilii sau flagelii. Alți autori folosesc fie termenul de „blefaroplast", fie cel de „cinetozom", pentru a denumi orice fel de corpuscul de la baza cililor sau flagelilor protozoarelor, protofitelor sau celulelor metazoarelor.

Centriolul este o formațiune cilindrică cu dimensiuni medii de 4,50 μ lungime și 1,70 μ Ø, al cărui perete este format din 9 triplete sau fibrile longitudinale care, la rîndul lor, sînt compuse din cîte 3 subfibrile adiacente — *A, B* și *C.* Subfibrilele *A* și *B* ale cinetozomilor se prelungesc cu dubletele periferice ale cililor ; subfibrila *C* se află numai la nivelul centriolar și al cinetozomilor.

La un centriol distingem un *cap proximal,* un *lumen* cu aspectul în secțiune transversală de osie cu spițe și un *cap distal,* mai mult sau mai puțin închis de o placă terminală. Cele 9 triplete sînt așezate într-un cerc perfect spre extremitatea distală, dar devin oblice în raport cu acest cerc începînd de la mijlocul spre partea proximală a centriolului, astfel că subfibrila *C* este mai la exterior. Dacă observăm — pe secțiuni — cilindrul centriolar de la extremitatea sa proximală, tripletele converg spre interiorul centriolului pe axe care se îndoaie în sensul acelor de ceasornic (fig. 49, *B*). Dacă privim centriolul de la extremitatea sa distală, axele tri-

Scanned with OKEN Scanner

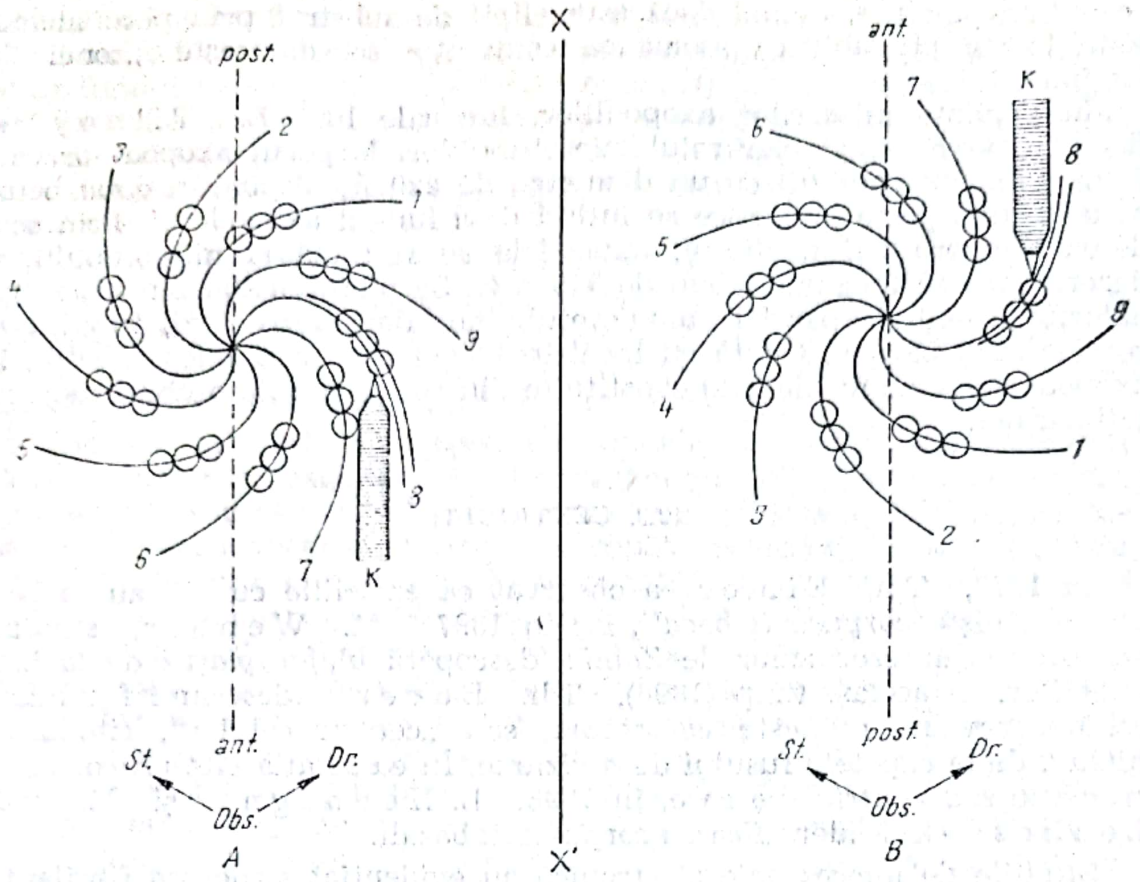


Fig. 49. Orientarea secţiunilor transversale prin centriol : *A* — centriolul văzut de la exteriorul celulei, la extremitatea sa distală ; observatorul *(Obs.)* se găseşte de la partea anterioară a cineţiei ; *B* — centriolul văzut de la interiorul celulei, prin extremitatea sa proximală :
ant. — anterior ; *post.*- posterior ; *Dr., St.* — partea dreaptă şi stîngă a observatorului *(Obs.)* şi a celulei ; *K* — cinetodesmă ; *XX'* — direcţia cineţiei ; *1—9* — tripletele (după J. G r a i n).

pletelor se îndoaie spre axul central al centriolului, invers decît acele de ceasornic (sens trigonometric) (fig. 49, *A*).

Examinarea micrografiilor electronice seriate au arătat că, într-o cineţie (complexul cinetozom-cil sau flagel sau cinetida lui C h a t t o n), fibrele axiale de la baza cilului sînt aşezate într-un plan perpendicular cu direcţia cineţiei şi în axul cineţiei se află dubletul 1 care corespunde tripletului 1 din acelaşi ax (fig. 50).

Pe lîngă această structură fundamentală a centriolilor se mai găsesc şi o serie de structuri secundare. Este cazul unor filamente fine care leagă fibrila *A* cu *C* a tripletului alăturat.

În partea proximală a centriolului o serie de raze fin granulate unesc fiecare triplet cu un miez cilindric, totul luînd aspectul unei „osii cu spiţe". În partea mijlocie a centriolului sînt corpi opaci în număr variabil (1 la *Tetrahymena*, 4—5 la *Paramaecium*, mai mulţi la *Froettingeridae*, pe toată lungimea lumenului centriolului la *Stentor*). La partea distală, centriolul conţine un strat transversal de material dens cunoscut ca *placă terminală*, iar deasupra sa se află un sept adiţional subţire. La nivelul

Scanned with OKEN Scanner

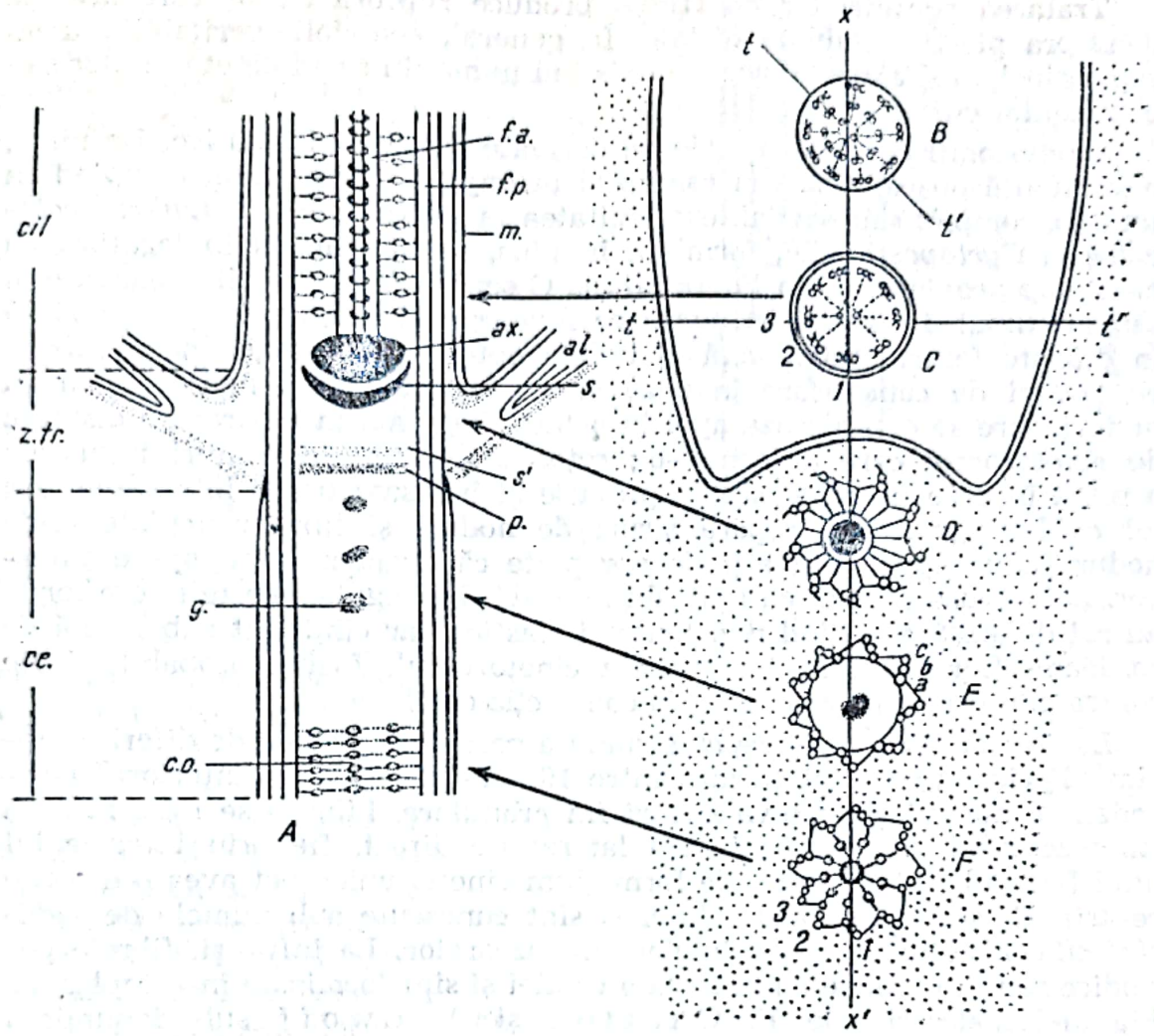


Fig. 50. Secţiune schematică longitudinală şi transversală prin centriol şi flagel (după J. Grain) : *A* — secţiune longitudinală ; *B* — secţiune transversală a cilului torsionat faţă de axul longitudinal al cineţiei (XX') ; *C* — secţiune transversală prin cil, aproape de bază ; planul *tt'* al fibrelor axiale este perpendicular cu axa *xx'* a cineţiei ; D — secţiune transversală prin regiunea de tranziţie a cilului ; *E* — secţiune prin mijlocul centriolului ; *F* — secţiune prin partea proximală, în formă de spiţe de roată ; *a, b, c* — numerotarea subfibrilelor tripletelor ; *al.* — alveole citoplasmatice ; *ax.* — axozomi ; *ce.* — centriol ; *c.o.* — corp central opac ; *f.a.* — fibre axiale ; *f.p.* — fibre periferice ; *g.* — granule axiale ; *m.* — membrană celulară ; *p.* — placa terminală ; *s.* — septum terminal, adiţional ; *s'.* — septum principal ; *z.tr.* — zonă de tranziţie, *1, 2, 3* — sensul numerotării tripletelor.

plăcii terminale se termină subfibrila *C* din triplete, ea limitînd centriolul din partea tranziţională a cilului. Şi mai sus se evidenţiază axozomul lenticular, care se află pe un sept principal în formă de cupă situat în dreptul suprafeţei celulare. La nivelul axozomului se termină cele două fibre axiale ale celulei.

Porţiunea cuprinsă între placa terminală şi partea superioară a axozomului este o zonă de tranziţie între centriol şi cil (v. fig. 50).

Scanned with OKEN Scanner

Tratarea paramecilor cu $NiSO_4$ produce ruptura cililor care are loc deasupra plăcii terminale distale. În general, centriolii veritabili nu au sept principal și axozom, aceștia existînd numai în cazul cinetozomilor sau centriolilor ciliferi.

Cinetozomii prezintă o serie de derivate intracitoplasmatice. De pildă, o substanță opacă, densă și osmiofilă înconjură cinetozomul, astupînd ca un dop, complet sau parțial, extremitatea sa proximală ca la *Ophryoscolecidae* și *Cycloposthiidae*, formînd, în plus, și un manșon în legătură cu acest dop proximal, ca la *Balantidium*. O serie de microfibrile apar lateral sau proximal din matricea densă ce învelește cinetozomul și se prezintă în diferite feluri : rețea laxă la baza cinetozomului ; rețea neorganizată cu noduri de condensare la baza cinetozomilor ; rețea neorganizată cu noduri, care se organizează apoi în ochiuri regulate la o oarecare distanță de cinetozomul care a format-o ; rețea organizată în ochiuri regulate ; o rețea în care nodurile sînt suprapuse și îndesate unele într-altele, așa fel că linii granulare separă șiruri de noduri și fibre reticulate unde nodurile suprapuse sînt atît de apropiate că formează linii opace transversale dispuse regulat ca la o fibră striată. De regulă, aceste microfibrile au rol de susținere fiind rezistente și elastice, iar cînd sînt sub formă de cordoane fibroase fără legături cu cinetozomul, foarte probabil să fie contractile și să participe, deci, la contracția celulelor.

La *Urceolaria* apar fibre cu structură periodică, groase, de diferite lungimi. Perioada striației variază între 165 Å—500 Å și, în interiorul perioadei, se mai găsesc cîteva striuri fin granulare. Fibrele se nasc la baza cinetozomului de care se inseră lateral fie direct, fie prin intermediul unui fascicul fibros. Astfel de formațiuni cinetozomice pot avea o direcție centripetă, spre interiorul celulei și sînt cunoscute sub numele de *rădăcini ciliare periodice* ale celulelor metazoarelor. La infuzori, fibrele periodice rămîn paralele cu suprafața celulei și sînt localizate în ectoplasmă. Ele au fost descrise de E. Chatton și A. Lwoff sub denumirea de *fibre cinetodesmale*, care unesc cinetozomii între ei de-a lungul cineției. Această cinetodesmă se află la dreapta cinetozomilor, adică ei sînt „sudați" de marginea stîngă.

În urma unor cercetări aprofundate de microscopie electronică, J. Grain (1969) definește *fibra cinetodesmală* ca avînd o structură periodică, luînd naștere la exteriorul cinetozomului, spre baza sa, de partea antero-laterală dreaptă, la nivelul tripletelor 5, 6, 7, 8 și care se îndoaie antero-laterală cu suprafața celulei, chiar în ectoplasmă. Cu ajutorul lor cinetozomul ciliatelor se ancorează bine în celulă și, în unele cazuri, constituie adevărate piese scheletice care susțin, de pildă, ventuza anterioară a *Hysterocinetidelor*, sau devin compacte ca niște spiculi la *Mesnilella*.

Tot la extremitatea proximală a cinetozomilor ciliatelor pot apărea fibre tubulare de 250 Å ∅, cu un perete răsucit, de 25—70 Å grosime. Acești microtubuli formează rădăcini ciliare tubulare și fibre tangențiale tubulare. Rădăcinile se înfundă în citoplasmă după ce s-au format, începînd de la extremitatea proximală a cilindrului cinetozomal. La unii infuzori tubulii lor sînt localizați pe formațiuni dense care astupă extremitatea proximală ; la alții se leagă prin microfibrile de această extre-

Scanned with OKEN Scanner

mitate. Tubulii rareori sînt puţini la număr şi flexuoşi *(Balantidium)*; de cele mai multe ori sînt grupaţi în pachete sau *nemadesme* cu o structură paracristalină (fig. 51). Astfel de nemadesme constituie armătura citofaringelui infuzorilor gimnostomi şi a părţii goale a peretelui vestibulului de la infuzorii tricostomi. Nemadesmele se găsesc în jurul vacuolelor cu concreţiuni de calciu de la *Paraisotrichidae* şi formează *fibrele retrociliare* din zona ciliară adorală de la *Entodiniomorfe*, unde participă la mişcările de protecţie şi retracţie a zonelor ciliare. *Fibrele tangenţiale* apar ca *fibre transversale* şi *fibre postciliare*. La *Tetrahymena pyriformis*, R. Allen a arătat că fibrele transversale sînt fişii de cîte 5—9 microtubuli paraleli şi lipiţi unul de altul ce iau naştere de pe partea stîngă a bazei cinetozomului. Apoi se ridică în sus, devin subpeliculare şi se prelungesc în creasta intercineţială vecină pe care o străbat perpendicular cu direcţia cineţiei. La dreapta şi posterior cinetozomului se formează fibrele postciliare dintr-un număr variabil de microtubuli, care se ridică puţin spre suprafaţă devenind subperpendiculari, după care se îndoaie spre partea posterioară a cineţiei. Aceste fibre tubulare au rolul de a menţine forma infuzorilor. Ele, nemodificîndu-şi lungimea şi grosimea în cursul contracţiei celulei, numai alunecă unele faţă de altele. Microtubulii îşi rup în acest caz desmozele care-i solidarizează, dar le refac după aceea instantaneu (fig. 52).

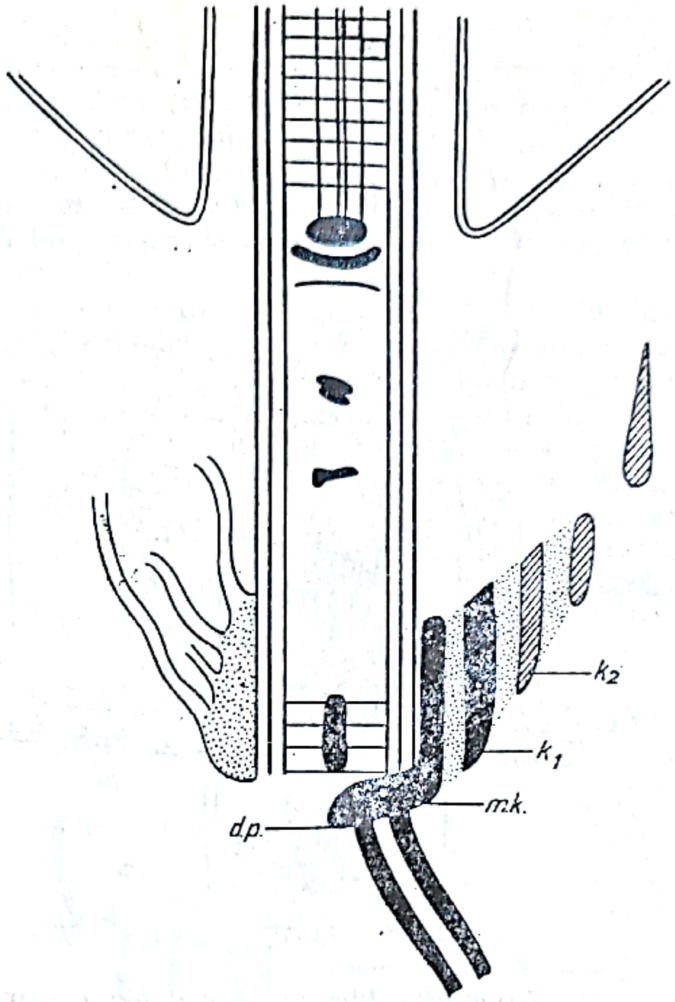


Fig. 51. Secţiune longitudinală în cinetozom de la *Balantidium elongatum*, în jurul căruia un material dens formează manşonul cu fibra cinetodesmală :
m.k., k_1 şi k_2 — fibre cinetodezmale născute din alţi cinetozomi din aceeaşi cineţie ; *d.p.* — dop principal (după J. Grain).

Este interesantă de reţinut ideea lui E. Hanson conform căreia cinetozomul creează în jurul său un „microclimat" aparte, care poate induce elaborarea unui cinetozom nou sau a altor structuri derivate, pe seama unor polipeptide precursoare. J. Grain crede că proteinele, sintetizate în apropierea cinetozomului sau chiar în altă parte a citoplasmei, se acumulează în jurul cinetozomului, formînd astfel structurile

Scanned with OKEN Scanner

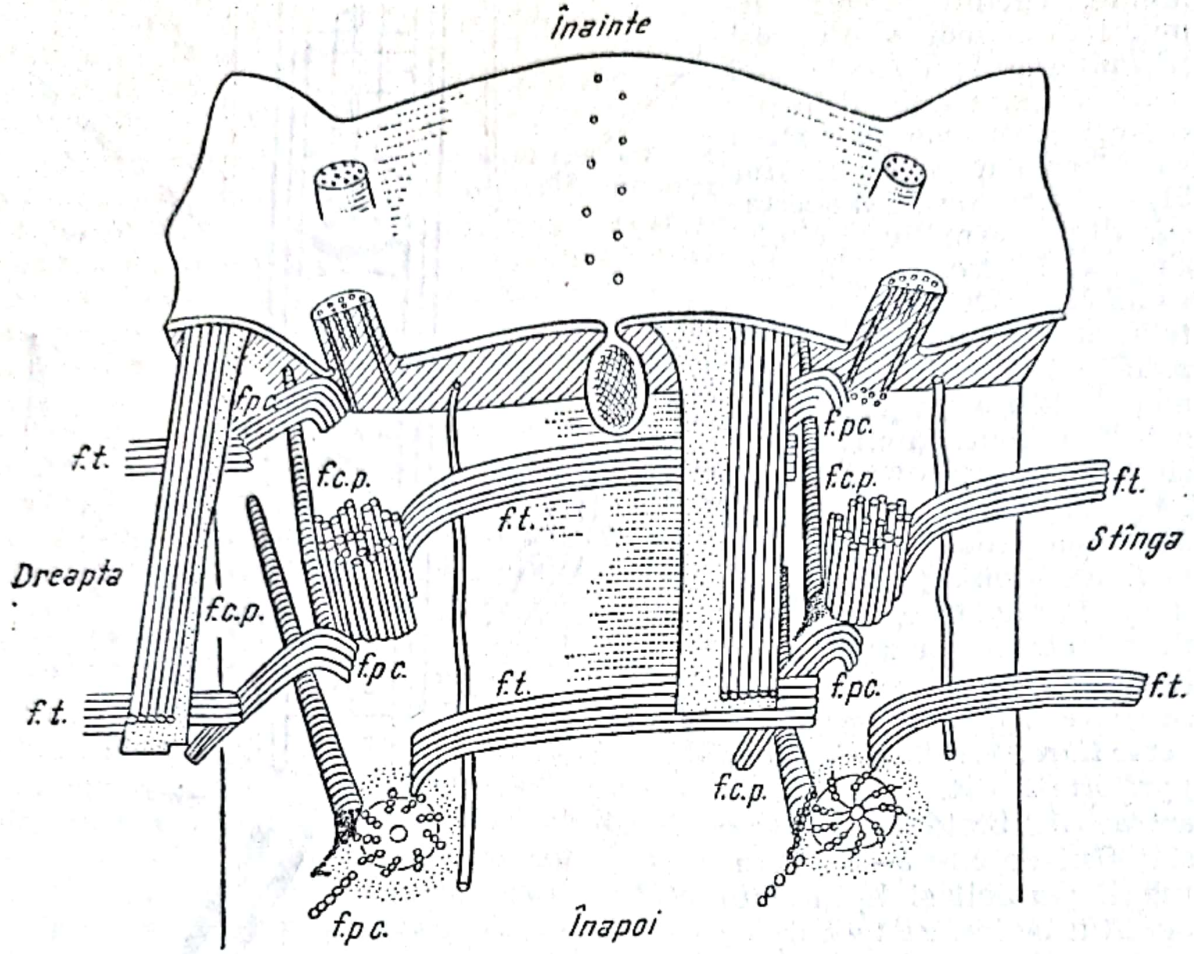


Fig. 52. Structurile fibrilare anexe ale cinetozomului în cortexul de la *Tetrahymena pyriformis.*
Secțiunile cinetozomilor și cililor sînt văzute de la exteriorul infuzorului. Fiecare cinetozom poartă înainte și la stînga fibre transversale tubulare (*f.t.*), înapoi și la dreapta fibre postciliare tubulare *(f.pc.)* și înainte și la dreapta fibra cinetodesmală periodică (*f.c.p.*) (după A l l e n).

anexe dense. Pe seama stocului proteic dens al dimerilor de tubulină de la baza cinetozomului se organizează apoi microfibrilele, microtubulii și formațiunile cu structură periodică, toate profunde, iar lateral fibrele cinetodesmale înaintea și la dreapta centriolului, apoi fibrele tubulare postciliare în urma și la dreapta centriolului și fibrele transversale înaintea și la stînga lui.

Astfel, potențialitățile de construcții moleculare sînt diferite și se manifestă după sectoarele aceluiași cinetozom. Inducția organizatoare se exprimă deosebit conform cu diferitele sectoare ale zonei pericinetozomale, dar totdeauna la fel în cadrul aceluiași sector. Această inducție organizatoare este în funcție de polaritatea cinetozomului și de teritoriul înconjurător, polaritate care se manifestă prin asimetria structurilor cinetozomale. Cinetozomul este, deci, centrul organizator al cineției și locul de formare a derivatelor lui (formațiunile opace-dense și cele fibrilare), ceea ce indică potențialitățile sale citomorfologice. Unii autori au insis-

tat asupra conținutului în ADN și ARN al centriolilor (2×10^{-16} g ADN per centriol), fapt care sprijină teoria continuității genetice după care formarea unor cinetozomi noi nu pare posibilă decît prin preexistența unui cinetozom. În același timp, este bine stabilit conținutul în acizi nucleici al centriolilor și, în plus, este foarte probabil ca aceștia să se formeze „de novo" în cazul fusurilor de diviziune al blastomerelor aricilor de mare, ca și în cazul amiboflagelatelor.

Dar, în cazul multor celule, cinetozomii nu sînt izolați ci se asociază în diferite moduri. Cea mai simplă asociație este perechea de cinetozomi care se găsește fie în zonele somatice, fie în zona bucală a ciliatelor. În regiunea somatică, un cinetozom anterior se află la stînga și înaintea cinetozomului posterior. Ei pot fi legați între ei prin fascicule subțiri de microfibrile *(Paramaecium)* sau prin substanțe cimentate *(Bresslaua)* Din cinetozomul posterior ia naștere o fibră cinetodesmală și o rețea de fibre postciliare, iar din cel anterior un rînd de fibre transversale (fig. 53). Deci, asociația a doi cinetozomi nu atrage după sine multiplicare formațiunilor fibrilare anexe, perechea de cinetozomi fiind echiva-

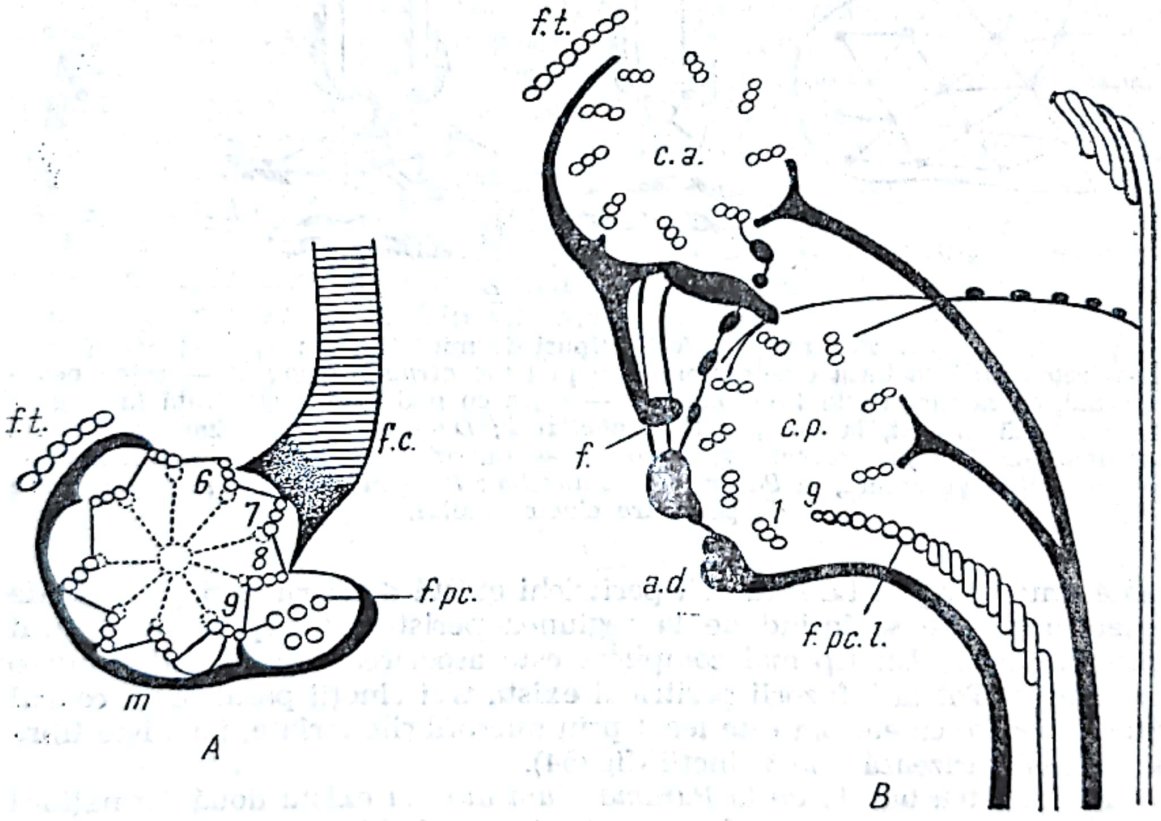


Fig. 53. Derivate centrozomiene văzute în secțiuni transversale în cinetosom, de la interiorul celulei :

A — într-un cinetozom izolat : *f.c.* — fibra cinetodesmală este în legătură cu tripletele 6, 7, 8 ; *f.t.* — fibrele transversale sînt înaintea și la stînga cinetozomului ; *f.pc.* — fibrele postciliare sînt la dreapta și înapoi, legate de tripletul 9 ; *m* — manșon de substanță densă ;

B — într-o pereche de cinetozomi somatici de *Spirostomum* fibra cinetodesmală nu se vede : *a.d.* — anvelopă densă ; *f.pc.l.* — fibre postciliare foarte lungi ; *c.a.* — cinetozom anterior, cu fibre transverse (*f.t.*) ; *c.p.* — cinetozom posterior cu fibre postciliare ; *f* — fibre striate.

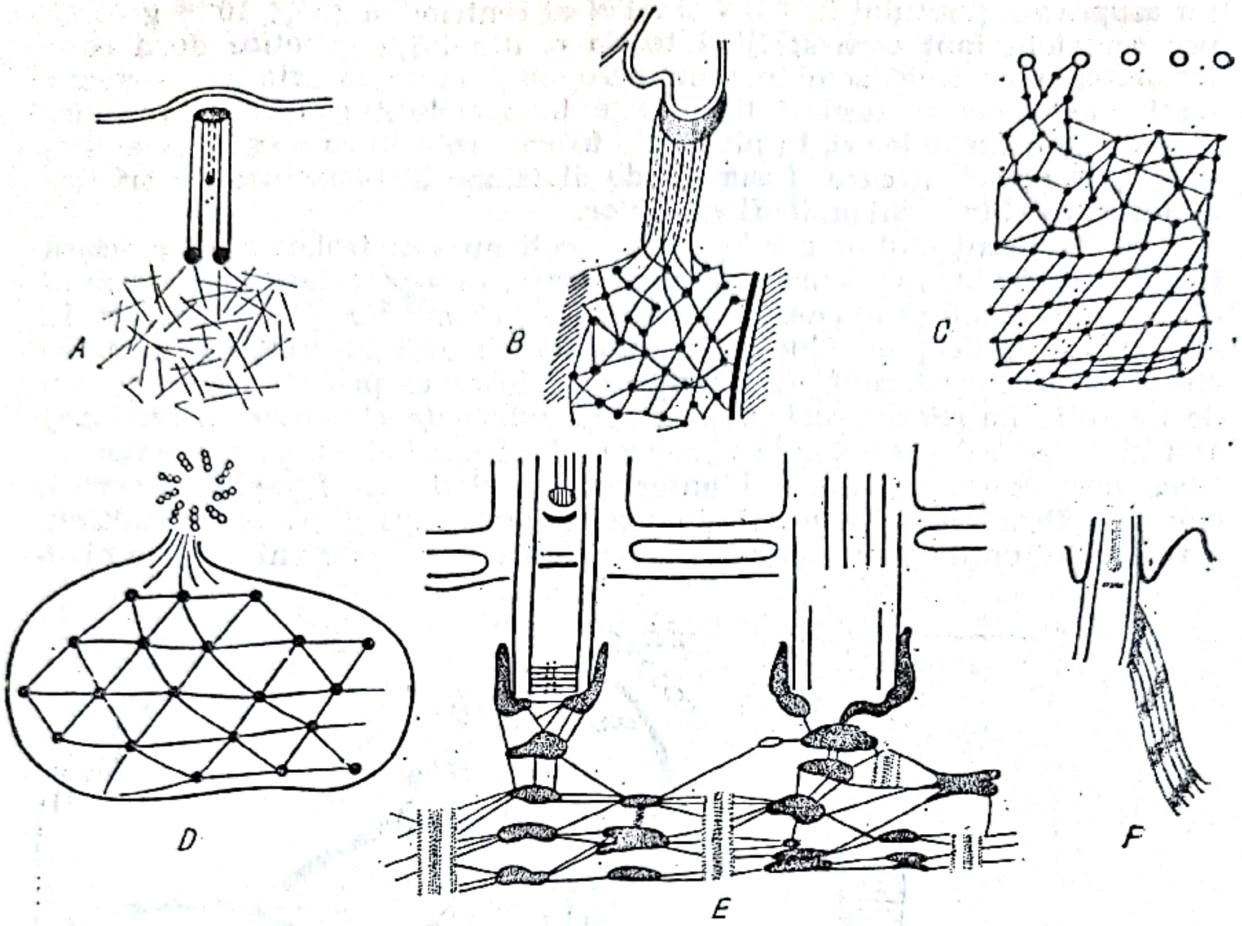


Fig. 54. — Diferite tipuri de microfibrile :
A — rețea laxă la baza cinetozomilor de la *Urocentrum turbo* ; *B* — rețea neorganizată, cu noduri, de la *Frontonia* ; *C* — rețea cu noduri, neorganizată la origine și organizată în rest, la *Campanella umbellaria* ; *D* — rețea organizată cu noduri de condensare de la *Urocentrum turbo* ; *E* — microfibrile în rețea organizată, cu noduri și linii granulare, la *Paramaecium aurelia* ; *F* — microfibrile striate născute de pe latura cinetozomului.

lentă unuia singur. La infuzorii peritrichi există două rînduri paralele de cinetozomi care se întind de la regiunea peristomiană pînă la capătul infundibulului. Un tip mai complicat este asocierea cinetozomilor într-o policinetie. Tot la infuzorii peritrichi există trei cinetii paralele în cadrul cărora fiecare cinetozom este legat prin microfibrile striate, iar niște fibre subțiri solidarizează cele 3 cinetii (fig. 54).

În cavitatea bucală de la *Paramaecium aurelia* există două formațiuni numite *penipulus* formate fiecare din 4 cinetii. Sistemele fibrilare care derivă din acestea determină două zone în cavitatea bucală, una anterioară și alta mai profundă ; mai ales în zona anterioară legăturile dintre cinetozomii aceluiași penipulus sînt evidente în sensul în care sînt diferențiate în patru tipuri.

Un alt mod de asociere a cinetozomilor este membrana formată din 3—4 rînduri de cili care poate fi omologată cu o cinetie. Atunci cînd se asamblează cîteva rînduri scurte și paralele de cinetozomi ciliferi într-un pachet cu perimetrul hexagonal se realizează un *cir*, iar cînd asambla-

Scanned with OKEN Scanner

rea de cinetozomi se întinde pe o mai mare suprafaţă, în mod neîntrerupt şi într-o direcţie, născînd pachete de cili separate între ele, avem de-a face cu un *sincil.*

Formarea acestor structuri se poate studia în cursul trecerii unor forme care nu le conţin în forme flagelate. Astfel, este posibil să se provoace experimental la *Risomastigine* trecerea de la forma amoebiană la cea flagelată. Astfel, la *Naegleria* diplozomul apare brusc la contactul cu nucleul, după ce ergastoplasma din parazom, condensată, se normalizează.

Formarea centriolilor este legată de informaţia nucleului dată ergastoplasmei. Astfel, la *Tetramitus,* se văd mici procinetozomi în contact cu o prelungire digitiformă a suprafeţei nucleare şi înconjuraţi de o citoplasmă densă. Apoi unul din centrioli se alungeşte şi se înconjură cu o veziculă pinocitară ca într-un deget de mănuşă, după care diplozomul migrează la suprafaţa celulei iar fibrele axonemei se dezvoltă într-o evaginaţie a membranei plasmatice. De-a lungul viitoarelor teci flagelare există densificări citoplasmatice şi microfibrile cu o substructură periodică de 35—50Å. Asemenea fibrile se încorporează în fibrele axolemei constituind mai întîi fibrile centrale şi apoi periferice, care se vor orienta după aceea într-o generatoare circulară.

Cum se poate vedea, centriolii servesc ca „loci" pentru producerea unor noi centrioli şi corpusculi bazali generatori de cili, în acelaşi timp avînd proprietatea să atragă microtubulii citoplasmatici atît în cazul constituirii axonemelor în cazul cililor şi flagelilor, cît şi în cazul constituirii fusului de diviziune şi asterilor.

Funcţionarea cililor şi a flagelilor realizează mobilitatea celulelor libere, a lichidelor de pe suprafaţa epiteliilor ciliate şi a larvelor şi animalelor acoperite de cili. Tipurile mişcărilor sînt diferite. Astfel, un mare număr de flageli se ondulează simetric în acelaşi plan, undele pornind de la bază în sus dar şi invers, în alte cazuri. Alteori flagelii bat helicoidal, undele propagîndu-se de la bază către extremitatea lor. Frecvenţa bătăilor este de 10—40 Hz, iar viteza de propagare a ondulaţiilor de 100—1000 mμ/s (fig. 55). Un cil de 12 μ lungime bate de 30 de ori pe secundă

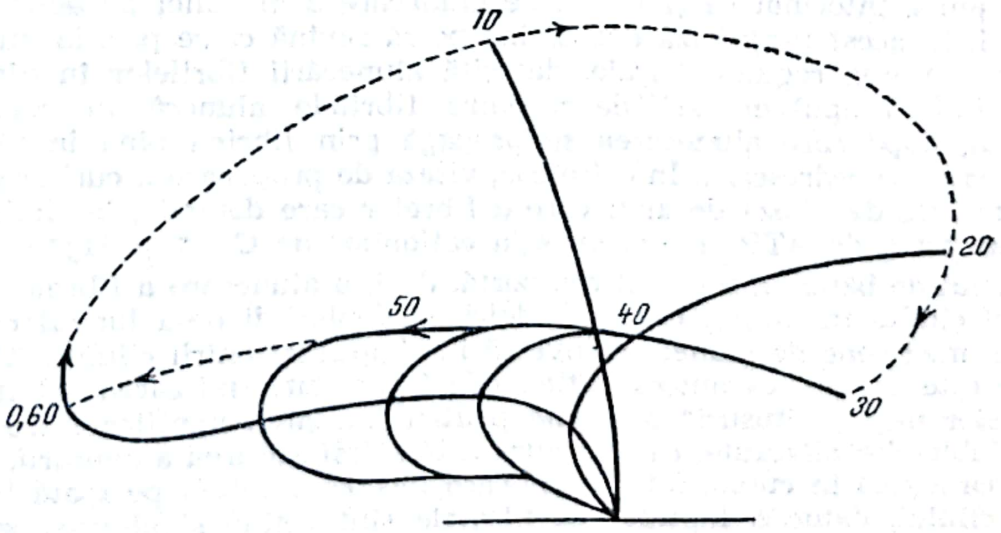


Fig. 55. Schema bătăii flagelului.

cu o viteză unghiulară de 12°/m/s şi o viteză a extremităţii de 2,5 mm/s. La revenire, curbura descrisă de cil se propagă de-a lungul său cu o viteză de 350 mμ/s. Un cil gigant de 600 μm lungime bate de 20 de ori pe secundă cu o viteză unghiulară de 10°/m/s şi cu o viteză la vîrf de 100 mm/s, iar curbura lui se propagă cu 17 mm/s la revenire.

Pentru a explica mecanismele ciliare trebuie făcute cîteva precizări asupra compoziţiei macromoleculare a cililor. Cele două fibrile centrale ale axonemei au cîte 20 nm fiecare şi prezintă un perete dens de 4 nm grosime. Aceste fibre sînt microtubuli cu pereţi circulari compuşi din 13 rînduri de proteine globulare. Cele două dublete periferice par şi ele a avea o structură microtubulară dar între ele există un singur perete, astfel că aceste dublete au fiecare cîte 23 de rînduri de proteine, denumite *tubulină*, cu o compoziţie în aminoacizi asemănătoare actinei.

La intrarea în cil fibrilele centrale se întrerup şi nu mai pătrund în centriol ; în schimb, la cele nouă perechi de dublete periferice se mai adaugă cîte una formînd nouă triplete. O singură subfibrilă din dubletele periferice poartă două rînduri de protuberanţe care se îndreaptă spre dubletul vecin în sensul acelor de ceasornic, dacă privim de la baza tijei ciliare. Aceste braţe au 150 Å lungime şi 80 Å grosime, dar lipsesc şi de la vîrful şi de la baza cilului. Se consideră că fiecare braţ este o macromoleculă proteică numită *dineină*, care are proprietate ATP-azică în prezenţa Ca^{++} şi Mg^{++}.

La începutul fiecărei bătăi active, fibrele sînt la acelaşi nivel. Braţele realizează joncţiuni oblice între fibrele periferice vecine care generează o forţă de alunecare pe toată lungimea şi circumferinţa fibrilelor, în afară de fibrilele 5 şi 6 care sînt legate într-un punct imobil. Hidroliza ATP-ului de către dineina braţelor este aceea care produce energia necesară mişcării cililor. Astfel, alunecarea activă a fibrilelor pe toată lungimea cilului provoacă curbura lui în punctul cel mai slab, adică la bază, unde braţele lipsesc şi imediat deasupra acestui punct, unde sînt defazaţi din cauza curburii care s-a produs dedesubt. În partea rectilinie a tijei ciliare, liniile încrucişate între dubletele de fibrile consolidează cilul care rămîne drept. Viteza de alunecare a unei fibrile faţă de vecinele ei este de 1—10 μm/s, întocmai ca şi viteza de alunecare a miozinei pe actina din muşchi. În acest timp baza cilului începe să revină către poziţia iniţială, prin redresarea regiunii bazale, datorită alunecării fibrilelor în direcţia inversă. În timpul mişcării de revenire fibrilele alunecă în regiunea curbată, după care alunecarea se propagă prin fibrină pînă în vîrf şi astfel cilul se redresează. În orice caz, viteza de propagare a curburii este determinată de viteza de alunecare a fibrelor care depinde, la rîndul ei, de cantitatea de ATP şi concentraţia cationilor de Ca^{++} şi Mg^{++}.

Ciclul de bătaie a unui cil comportă, deci, o alunecare a fibrelor de-a lungul cilului în timpul eficace îndoirii şi deplasării de-a lungul cilului a unei mici zone de alunecare inversă în timpul revenirii cilului. Alunecarea este un proces autocatalitic ; odată începută, mişcarea relativă a fibrilelor naşte „situsuri" adecvate pentru formarea punţilor între braţele dubletelor alăturate, care asigură astfel desfăşurarea alunecării. Alunecarea activă în cursul mişcării eficace începe simultan pe toată lungimea cilului, datorită faptului că fibrilele sînt rigide şi alunecă solitar pînă ce se ajunge la o anumită rază de curbură a cilului impusă de

Scanned with OKEN Scanner

această rigiditate. În mișcarea de revenire alunecarea în direcția inversă este posibilă datorită slăbirii tensiunii punților dinspre baza cililor, cînd curbura s-a deplasat de-a lungul lor. În privința travaliului produs de către un cil de 32 μm lungime, care bate într-un mediu cu o anumită viscozitate, s-a constatat că el este de 4×10^{-9} erg./s.

C. Brokaw (1965) a măsurat pentru un spermatozoid de echinoderm, cu un flagel de 42 μm, o viteză de 158 μm/s, cu ondulații de 29,6 μm lungime și cu amplitudini de 4,5 μm și care bate de 30 de ori/s.

În concluzie, organizarea caracteristică de 9+2 a cililor și flagelilor este fundamentală atît la protiste, cît și la plante și animale pluricelulare. Desigur, dacă ne gîndim la multe alte variante pe care le întîlnim izolat în unele cazuri (9+1 la turbelarii, 9 la unii pești, 9+7 la unele trichoptere etc.), formula 9+2 reprezintă cea mai utilă structură din punct de vedere al eficienței mișcării, coordonării sale și al reglării ei. Ea funcționează pe aceleași baze moleculare ca și activitatea miofilamentelor hialoplasmei.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

MITOCONDRIILE ŞI RESPIRAŢIA CELULARĂ

Sursa de energie a organismelor aerobe este produsă prin respiraţie, care are loc în celule la nivelul mitocondriilor, unde moleculele nutritive sînt oxidate în CO_2 şi H_2O. Energia eliberată este folosită la sinteza adenozintrifosfatului, prin oxidarea fosforilantă.

3.1. MITOCONDRIILE — SEDIU AL PRODUCERII DE ATP (energie stocată)

3.1.1. STRUCTURĂ ŞI ULTRASTRUCTURĂ

Aceşti constituenţi citoplasmici — mitocondriile — au fost descrişi pentru prima dată de către A. Kölliker (1850) şi A. Altmann (1890), care i-a considerat a fi *unităţi fundamentale ale materiei vii*. La microscopul fotonic, mitocondriile apar ca bastonaşe cu capetele rotunjite, sau ca mici sferule (fig. 56). Diametrul lor variază între 0,3—0,7 μ şi lungimea între 1—4 μ. Într-un hematocit normal, care se divide rapid, s-au numărat circa 1000 mitocondrii de 5,1 μ fiecare, a căror totalitate reprezintă 18% din volumul celular şi 22% din volumul citoplasmei.

Fig. 56. Mitocondrie din nefrofagocite de filopode (1 500 x) (după M. Varo).

Prin metoda cinematografierii în contrast de fază a culturilor de ţesuturi M. Chèvremont a relevat faptul că nu există mai multe tipuri de mitocondrii, deoarece aceeaşi mitocondrie vie, observată timp de 10 minute, poate să-şi schimbe aspectul de 15—20 ori. Astfel, ele pot să se contopească, să se fragmenteze, să dea bucle laterale care se pot separa etc., într-un cuvînt, sînt extrem de *polimorfe*. Ele sînt şi *plastice*, adică reacţionează la multitudinea de factori externi (temperatură, anoxie, acizi, solvenţi ai lipidelor etc.). În celula vie mişcarea mitocondriilor poate fi *activă*, în sensul schimbării formei sau *pasivă*, în cazul vehiculării lor de către curenţii citoplasmatici.

Scanned with OKEN Scanner

Forma și mărimea mitocondriilor se schimbă în funcție de tipul celular. Astfel, în pancreas, mitocondriile au 10—12 μ, în oocitele de la *Rana* 20—40 μ, în hematociți 5,2 μ, în hepatomul transplantabil 1,6 μ, iar în mușchii zborului de la insecte 8 μ/0,6 μ. În schimb, numărul mitocondriilor este constant în timp la același tip de celulă, amiba *Chaos* având 500 000, embrionul echinodermului *Psammechinus* prezentînd blastomere cu 150 000, hepatocitul în regenerare 1 000, hepatocitul din tumori primare 800, iar din tumori transplantabile *A* 75 mitocondrii.

Prin reacții histochimice se pot distinge cu precizie mitocondriile din alte incluziuni citoplasmatice : prin *reacția NADI* (dimetilfenilendiamina este oxidată, în prezența α naftolului, de către citocromoxidaza *a* și a_3, producîndu-se albastru de indofenol) ; prin *colorația „supravitală"* cu o soluție 1% de verde Janus (colorantul se reoxidează la nivelul mitocondriilor unde este o mare cantitate de citocromi *c*, c_1, *a*, a_3, care se leagă de flavoproteine) ; prin *reacția cu săruri de tetrazoliu* [de exemplu, nitro-BT, care este o biclorură de 2,2′-di-*p*-nitrofenil-5,5′-difenil 3,3′-(3-3′-dimetoxi-4,4′- bifenilen ditetrazoliu), captează electronii de la sistemul transportorilor de electroni ai lanțului respirator mitocondrial, transformîndu-se în formazan colorat] ; prin *reacția cu diaminobenzidină* la *p*H = 9, care evidențiază citocromul *c*.

Perfecționarea metodelor de fixare, incluzie și de confecționare a secțiunilor ultrafine (de circa 600 Å) făcute la ultrotom l-a condus pe G. Palade să considere că structura fină a mitocondriilor este identică la protiste, plante și animale.

În general, mitocondria este o formațiune ca un sac înconjurată de o *dublă membrană*, cea externă întotdeauna netedă, în timp ce membrana internă este foarte variată, după organ și specie, datorită diferitelor *criste* sau *tubușoare* care proeminează înăuntru (fig. 57). Conținutul mitocondriei se numește *matrice*. Între cele două membrane există un *spațiu intermembranar*.

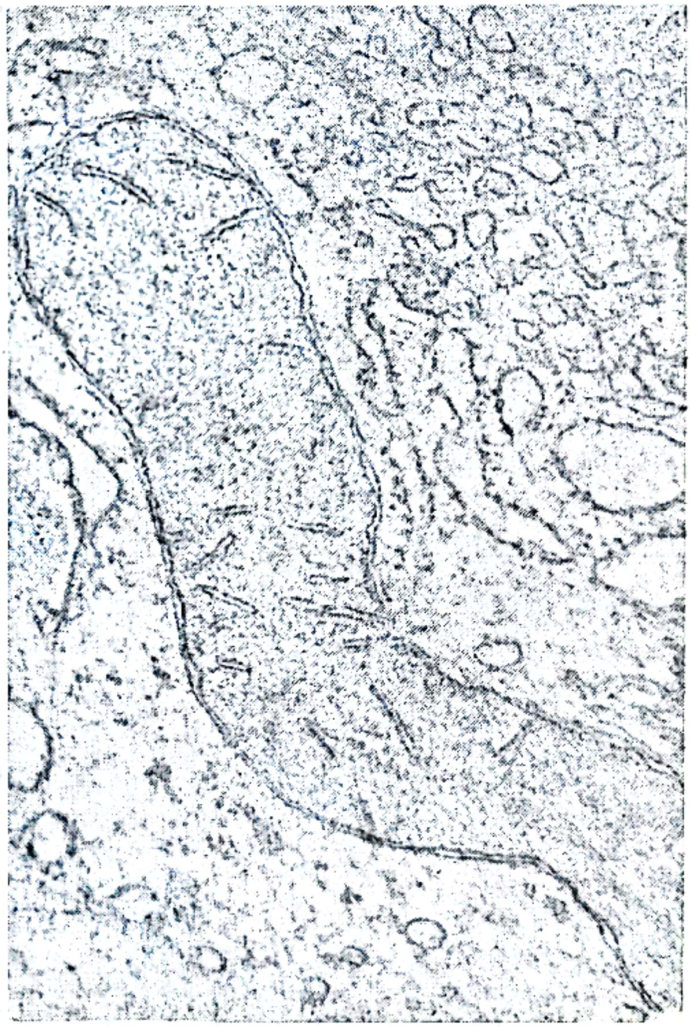


Fig. 57. Mitocondrie din hepatocit uman (18 000 x) (după M. Varo).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 58. Mitocondrii din hepatopancreasul de rac (20 000 x).

Scanned with OKEN Scanner

În activitatea de observare și inventariere a infrastructurii diferitelor feluri de celule s-a putut descrie și această mare variabilitate a membranei mitocondriale interne datorită invaginărilor sale. Astfel, în hepatocite, cristele ce se continuă cu membrana internă sînt scurte și matricea abundentă, în hepatomul transplantabil al șobolanului și în spermatidele de *Helix* sînt longitudinale, în spermatocitele de *Viviparus* în aceeași mitocondrie se află criste longitudinale, transversale și oblice, iar în mușchiul sartorius de la șobolan și în nefrocitele segmentului distal mitocondriile au un aspect sincițial cu criste în diferite direcții (fig. 58). Leucocitele umane, epiteliul traheal de la șobolan, mușchiul striat, hepatomul Norikoff, spermatocitele de scorpion etc. au criste ramificate și interconectate. La unele protiste, în celulele vegetale, în glanda adrenală, în tubii Malpighi și în axonii giganți, mitocondriile în loc de criste au tubuli întortocheați, iar în celulele interstițiale mitocondriile au tubuli scurți. Spermatidele de la *Opossum* și melc, ca și celulele miocardice, au cristele concentrice, iar spermatida de *Pieris brassicae*, *Filix domesticus* și *Rattus norvegicus* au mitocondrii cilindrice cu criste foarte scurte de parcă nici n-ar fi, mitocondria apărînd „goală".

Tot prin examinarea electronmicroscopică a fragmentelor de membrane interne întregi „colorate negativ" cu fosfotungstat de sodiu, Fernandez Morãn a descris *„particulele elementare"*, de 85 Å, atașate printr-un peduncul de fața internă a membranei.

3.1.2. CONSTITUȚIA MOLECULARĂ

Cercetările histochimice moderne au arătat că mitocondriile pot fi ușor evidențiate „in situ" prin *recția lui Backer* specifică fosfolipidelor. În plus, se pot detecta pe secțiuni proaspete și în subfracții mitocondriale o serie de enzime :

Membrana externă :

NADH-cytocrom-b_5-reductază (EC 1.6.2.2)
Cytocrom-b_5
Monoamin-oxidază (EC 1.4.3.4)
Lipidic acil-CoA-sintetază (ATP-dependentă) (EC 6.2.1.3)
Kinurenin-3-hidroxilază (EC 1.14.1.2)

Spațiul intermembranar :

Adenilat-kinază (EC 2.7.4.3)
Creatin-kinază (EC 2.7.3.2.)
Nucleozid difosfat-kinază (EC 2.7.4.6)

Membrana internă :

Lanțul respirator și enzimele fosforilării
NAD-NADP-transhidrogenază (EC 1.6.1.1)
NADH-dehidrogenază (EC 1.6.99.3)
Glicerofosfat-dehidrogenaza (EC 1.1.99.5)

Scanned with OKEN Scanner

Succinat-dehidrogenază (EC 1.3.99.1)
Colin-dehidrogenază (EC 1.1.99.1)
Beta-hidroxibutirat-dehidrogenază (EC 1.1.1.30)
Citrat-sintetază (EC 4.1.3.7)
Carnitin-acetil și palmitil-transferază

Matricea :

Malat-dehidrogenaza (EC 1.1.1.37)
NAD-legat izocitrat-dehidrogenaza (EC 1.1.1.41)
NADP-legat izocitrat-dehidrogenaza (EC 1.1.1.42)
2-oxiglutarat și piruvat, complexe dehidrogenazice
GTP-AMP-fosfotransferaza (EC 2.7.4.10)
Nucleozid difosfat-kinază (EC 2.7.4.6)
Aconitat-hidratază (EC 4.2.1.3)
Fumarat-hidratază (EC 4.2.1.2)
Glutamat-dehidrogenază (EC 1.4.1.3)
Enzime care participă la sinteza proteinelor și aminoacizilor
Enzime ale oxidării acizilor grași

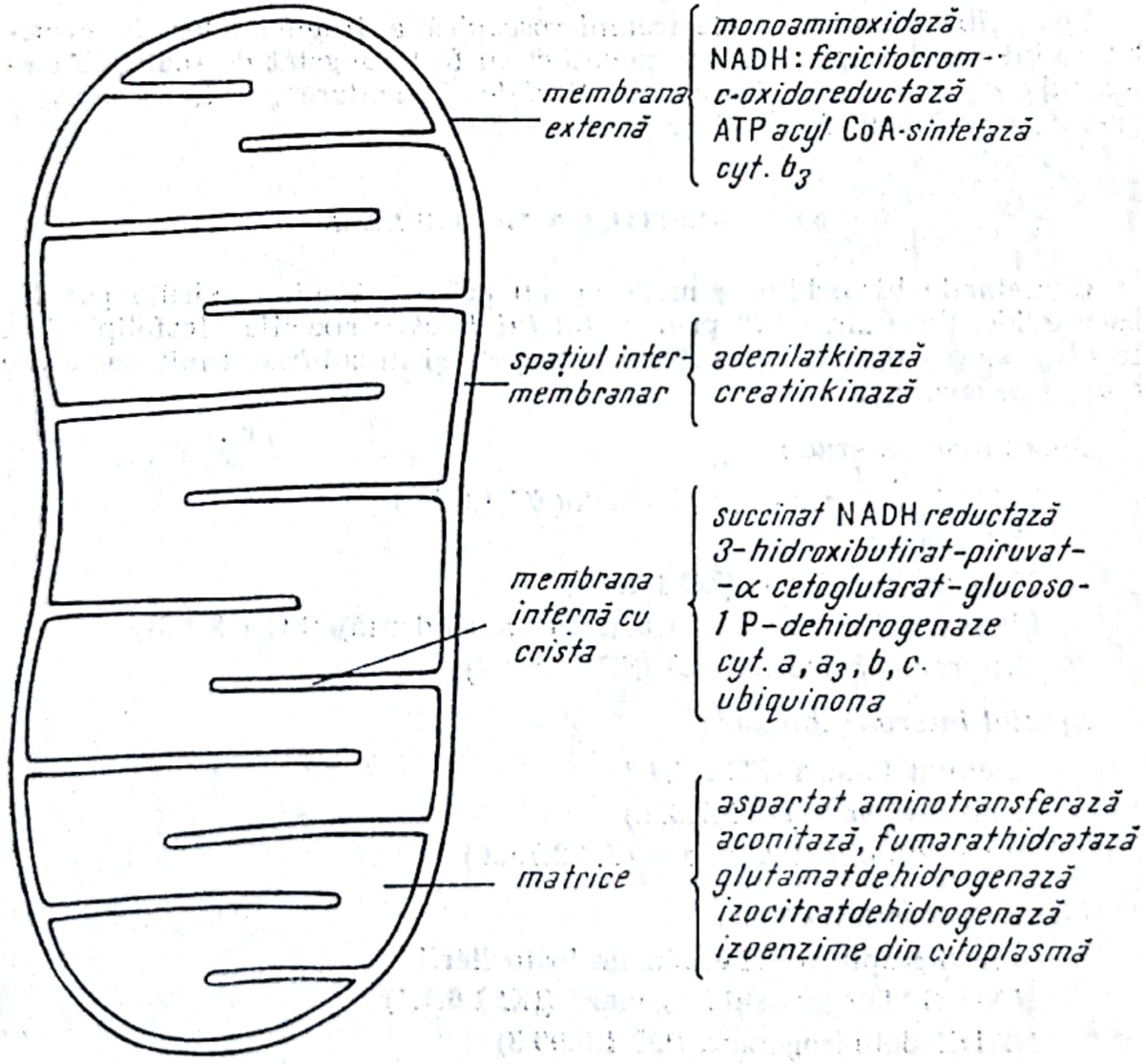


Fig. 59. Infrastructura mitocondriei și localizarea principalelor enzime.

Scanned with OKEN Scanner

Au fost propuse două modele de structură macromoleculară a membranei interne mitocondriale. Primul este acela trilaminar al lui Robertson, în care cele două straturi fosfolipidice stau între două pături proteice. Enzimele lanțului respirator și, în general, enzimele membranei interne stau prinse de asemenea tip de membrană. Proteinele de structură (de rețea) sînt hidrofobe, cu o GM 22 000 și n-au nici o activitate enzimatică, cu toate că sînt combinate cu cytocromi și fosfolipide. Ele reprezintă circa 35—45% din proteinele mitocondriale. Dar s-a obiectat că pot fi extrase fosfolipidele fără să se constate electronmicroscopic vreo modificare a membranelor mitocondriale; și, în plus, prin disocierea membranei interne cu săruri biliare se realizează izolarea fragmentelor lanțului respirator, care se reagregă spontan în vezicule cînd se elimină sărurile biliare. Formarea veziculelor membranare în asemenea condiții necesită prezența fosfolipidelor mitocondriale, și lanțul respirator poate fi reconstituit în absența oricăror proteine de structură. De aceea, D. Green și J. Perduc au propus un al doilea model în care membrana mitocondrială este formată din zece unități repetitive lipoproteice cu GM $1,2 \times 10^6$. Lanțul respirator și enzimele fosforilării sînt distribuite la mai multe unități (fig 59).

3.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ

3.2.1. IZOLAREA FRACȚIILOR ȘI SUBFRACȚIILOR MITOCONDRIALE

În 1934, R. Bensley și N. Hoerr au izolat pentru prima dată mitocondrii dintr-un omogenat, prin centrifugare diferențială. Dar marea lor fragilitate n-a permis obținerea unui sediment bine păstrat și necontaminat. Abia în 1948 G. Hogeboom, folosind o soluție de zaharoză hipertonică, a obținut mitocondrii întregi, separate de microzomii rămași în supernatant. În prezent se pot extrage în bune condiții mitocondrii, într-o soluție de zaharoză de 0,25 M la un *p*H=7,2 (adusă la neutralitate cu N. NaOH) prin centrifugare diferențială la 4°C. La tratarea mitocondriilor purificate cu detergenți ca digitonina, aceasta complexează cu colesterolul membranei externe care „se jupoaie" astfel după mitocondrie, rămînînd numai membrana internă. Green „a spart" asemenea membrane interne cu ultrasunete, obținînd 4 complexe bine caracterizate biochimic. Acestea sînt de natură lipoproteică și pot efectua fiecare în parte un anumit transfer de electroni, de la un donator anumit la un acceptor anumit. Însă complexele funcționează numai în prezența fosfolipidelor.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.2. ANALIZA CHIMICĂ

O apreciere globală a compoziţiei chimice a mitocondriilor izolate indică următoarele procente :

Apă	66%
Proteine	22%
Lipide	11%
Nucleotide	1%
Ioni	

De lipide, şi anume de lecitine şi cefaline, care reprezintă jumătate din cantitatea de lipide totală, sînt legate enzimele insolubile în apă. Nucleotidelè sînt reprezentate prin ATP şi ADP şi prin acceptorii de H^+, FAD, NAD, NADP şi prin Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}. Analiza subfracţiilor mitocondriale a arătat că membranele conţin fosfolipidele şi enzimele insolubile iar matricea enzimele solubile, ioni, ADN circular, ARN ribozomal, de transfer şi mesager, proteine bazice acide şi, probabil, actomiozină.

În mitocondrii, ca şi în cloroplaste şi granulele de vitelus, există un ADN asemănător cu acela de la procariote. Astfel, mitocondriile animalelor au circa 5 macromolecule de ADN circular de 5,5—5,6 μ lungime fiecare, în timp ce ADN-ul mitocondriilor vegetale este liniar, de 3,5—3,4 μ, al protistelor de 5—20 μ, ca şi al cloroplastelor. Greutatea moleculară a mitocondriilor animale este de 10×10^6, a mitocondriilor plantelor de $14—50 \times 10^6$, a celor de la protiste $10—40 \times 10^6$ şi a cloroplastelor de asemenea $10—40 \times 10^6$. S-a putut calcula chiar cantitativ acest ADN per organit celular. Astfel, o mitocondrie animală are între $0,5—2 \times \times 10^{-16}$ g ADN, una vegetală 10^{-16}g, la *Tetrahymena* $3,7 \times 10^{-16}$, la drojdii $1,3 \times 10^{-16}$, iar în cloroplaste se află o cantitate de mitocondrii care variază între $1—100 \times 10^{-16}$ g.

P. Borst a purificat ADN-ul mitocondriilor de la pui de găină şi a stabilit existenţa a două componente cu constanta de sedimentare între 39S şi 27S. S-a mers cu analiza pînă într-acolo încît se ştie astăzi că o moleculă de ADN mitocondrial are 40 bucle răsucite la dreapta, iar leucemicii şi celulele HeLa au duplexuri de molecule circulare închise, de 2—4 ori mai lungi ca acelea ale ADN mitocondrial din celulele necanceroase. Transformarea oncogenă a celulei înseamnă şi creşterea cu un multiplu de 5 a multimerilor circulari ai ADN mitocondrial.

Comparînd caracteristicile ADN din nucleul eucariotelor cu acela din procariote şi mitocondriile animale, se constată următoarele : ADN-ul nucleului eucariotelor este legat de histone, pe cînd cel din mitocondrii nu ; macromolecula de ADN cromozomal extrasă în soluţie este lungă de 174 cm, în timp ce ADN-ul circular mitocondrial are numai 5,5 μ iar cel mitocondrial liniar de la plante între 4 şi 35 μ. Frecvenţa G/C din ADN-ul cromozomilor eucariotelor este inferioară frecvenţei calculată pentru o distribuţie la întîmplare, în timp ce la ADN mitocondrial este egală sau superioară cu o astfel de frecvenţă. Proporţia G/C din ADN mitocondrial

Scanned with OKEN Scanner

de la animale este de 44% față de celelalte baze, la plantele superioare 47%, la protiste 23% și la cloroplaste 36%. Numai ADN-ul mitocondriilor plantelor superioare prezintă o diferență netă între compoziția în baze față de aceea a nucleului. Tot astfel, compoziția în baze este foarte diferită dacă comparăm ADN-ul mitocondriilor cu cel al cloroplastelor de la plantele superioare și protiste.

Ribozomii mitocondriilor sînt mai mici decît cei din citoplasmă, adică de 70S, cu un ARN de 23S și 16S. Acest ARN este codificat de către ADN-ul mitocondrial, pe această cale producîndu-se acizii ribonucleici necesari sintezei unor proteine mitocondriale.

3.3. ROLURI ȘI ACTIVITĂȚI FIZIOLOGICE

3.3.1. LEGĂTURILE BOGATE ÎN ENERGIE

Legăturile cu un potențial înalt energetic sînt indispensabile vieții. Catabolismul celular are particularitatea de a elibera energia liberă dintr-o substanță (ΔF sau ΔG) în etape. Niciodată în lumea vie energia dintr-un compus nu se eliberează dintr-odată și printr-o singură reacție. Cum toate viețuitoarele au nevoie de energie, ele și-o procură prin degradarea alimentelor. Energia eliberată astfel este transformată într-o formă specială de energie chimică și anume în *adenozintrifosfat* (ATP), compus cu un înalt potențial de transfer al grupării fosfat, sau, cum se mai spune curent, „bogat în energie". Abia după aceea celulele pot desfășura diferite activități în care se consumă energie (osmoză, mișcare, sinteze, motilitate etc.). Energia potențială o două legături fosfatice ale ATP este reprezentată prin potențialul lor de hidroliză.

F. Lipmann a fost de părere să se considere *legături bogate în energie* acelea care, prin hidroliză, degajă mai mult de 8 000 cal/mol și *legături sărace în energie* acelea care eliberează mai puțin de 3000 cal/mol. Legăturile cu un înalt potențial energetic se notează cu ~. Se cunosc șase tipuri de legături bogate în energie, dintre care 5 sînt ale derivaților fosforilați (pirofosfat, trifosfat, acil-fosfat, enol-fosfat, amidin-fosfat) și una ale acil-mercaptidelor (CoA).

Combustia alimentelor eliberatoare de energie are loc prin sute de reacții diferite, în schimb eliberarea energiei se realizează doar în cadrul cîtorva. În cursul catabolismului produsele de combustie sînt incomplet arse, așa că produsele terminale sînt diferitele forme ale acidului acetic (acetil-coenzima A, acidul α-cetoglutaric, acidul oxaloacetic).

Acetil-CoA este cea mai des întîlnită, reprezentînd două treimi din carbonul glucidelor, tot carbonul acizilor grași și jumătate din al acizilor aminați. Acidul α-cetoglutaric se formează pe seama mai multor acizi-aminați (acidul glutamic, histidină, arginină, prolină și hidroxiprolină), iar acidul oxaloacetic pe seama acidului aspartic. Acești trei compuși intră în cadrul ciclului tricarboxilic, care este etapa oxidării terminale a tuturor alimentelor. Este meritul lui H. Wieland (1912—1922), care a demonstrat că oxidările din cadrul respirației se produc prin dehidrogenare, iar O. Warburg a constatat că oxigenul joacă rol în

respirație sub formă ionică, activată, iar activarea lui se realizează prin cytocromul-*a*. Izolarea piridinnucleotidelor de către von Euler și a flavinnucleotidelor de către O. Warburg și H. Theorell a permis să se afle calea metabolică a respirației.

Ansamblul cunoștințelor privind respirația au fost integrate, grație lucrărilor lui A. Szent-Györgyi, în *teoria dublei activări*. Prin dehidrogenarea substraturilor se pierd, datorită dehidrogenazelor, unul sau mai mulți hidrogeni, care imediat sînt activați :

$$AH_2 \rightarrow A + 2H \rightarrow 2H^+ + 2e^- .$$

Oxigenul molecular este transformat în acest timp în oxigen activ de către citocromoxidază, care-i dă unul sau mai mulți electroni proveniți de la hidrogen și transportați de citocromi :

$$^1/_2\, O_2 + 2e^- \rightarrow O^{--} ;\ O_2 + 2e^- \rightarrow 2O^- .$$

Hidrogenul și oxigenul activați se unesc și formează apă sau apă oxigenată, descompusă de catalază :

$$2H^+ + 2O^- \xrightarrow{\text{catalază}} H_2O + {}^1/_2\, O_2 .$$

Formarea apei este o puternică reacție metabolică care se realizează prin oxidarea hidrogenului, NADH sau NADPH, cu o diferență de potențial de $\Delta\, G^\circ = 1{,}13$ V. Cantitatea de energie se eliberează progresiv prin intermediul unor transportori, iar o parte din energia eliberată se stochează în legături ~ cu o capacitate mare de Franfer de energie, așa cum a arătat F. Lipmann, care a stabilit rolul ATP în transformările enzimatice. H. Kalckar descoperă că oxidarea fosforilantă este cuplată cu respirația, dînd un nou orizont bioenergeticii.

Izolarea primelor mitocondrii intacte de către G. Palade, care a stabilit structura lor electronmicroscopică, a permis studiul activității multienzimatice ale acestui constituent citoplasmatic, denumită de către D. Green *ciclofora*ză, deoarece în mitocondrii are loc oxidarea substraturilor în cadrul ciclului Krebs și Lynen. A. Lehninger și D. Green au realizat disecția biochimică a mitocondriilor, reușind să stabilească secvențele fosforilării oxidante.

3.3.2. CICLUL KREBS

Reprezintă principala sursă de hidrogen a lanțului respirator (fig. 60), cu următoarele etape :

— condensarea acetil-CoA cu acidul oxaloacetic catalizat de citrat-sintetaza lui Ochoa produce *acidul citric* (fig. 61) ;

— acidul citric pierde o moleculă de apă formînd *acidul cisaconitic* care, la rîndul său, fixează o altă moleculă de apă transformîndu-se în *acid izocitric*. Amîndouă reacțiile sînt catalizate de aconitază (fig. 62) ;

— acidul citric din C_6 trece într-un *acid α-cetonic* în C_5, mai întîi prin dehidrogenarea acidului izocitric și apoi prin decarboxilarea acidului oxalosuccinic. Dehidrogenarea acidului izocitric se face prin scoaterea a 2H de

Scanned with OKEN Scanner

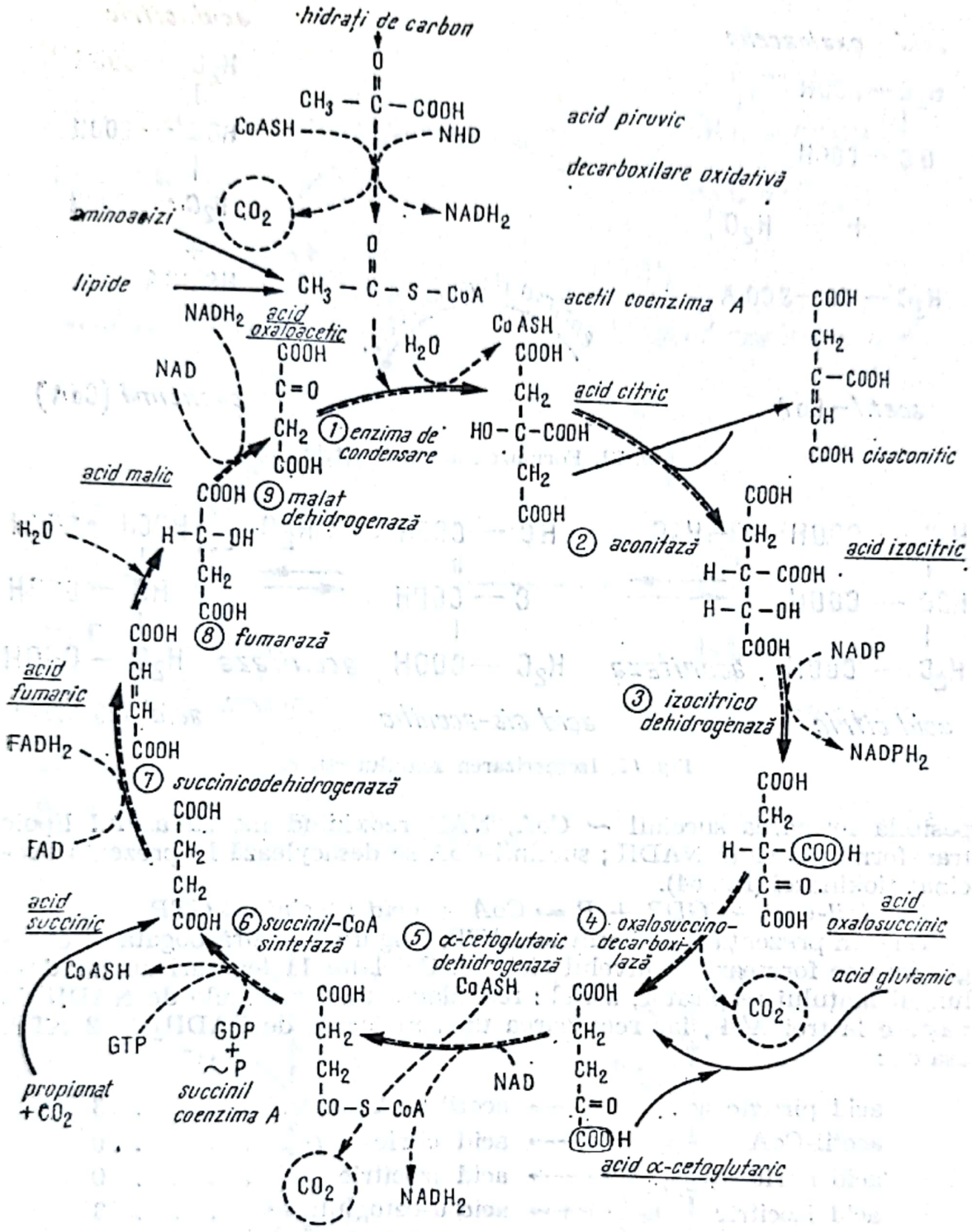


Fig. 60. Ciclul Krebs.

către izocitrico-dehidrogeneză, a cărei coenzimă-NAD se reduce. Rezultă *acidul oxalosuccinic* care se decarboxilează dînd acidul *α-cetoglutaric* în C_5 (fig. 63) ;

— acidul α-cetonic din C_5 trece în acizi cu C_4. Sub acțiunea pirofosfatului de tiamină (TPP) și a acidului lipoic (LSS), oxidaza cetoglutarică face

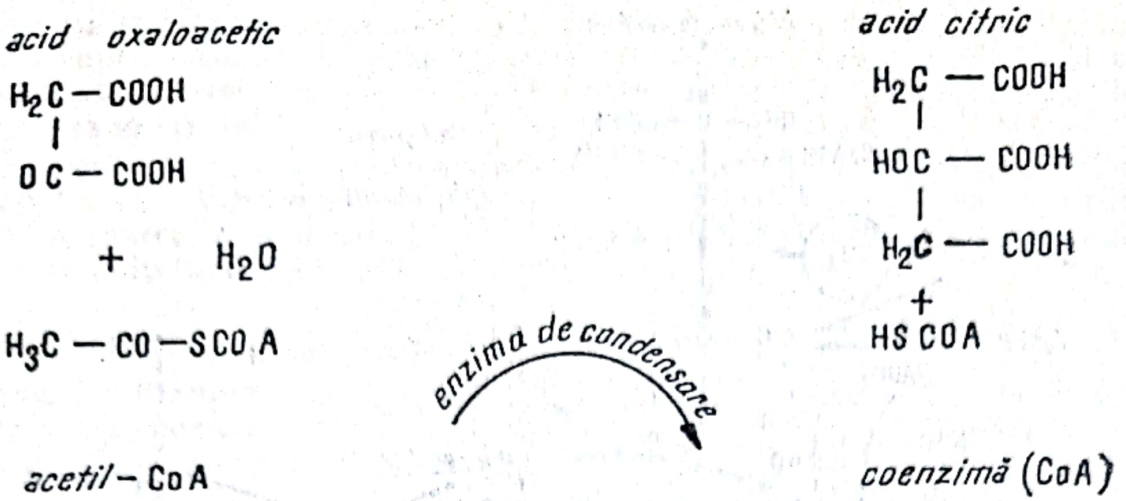


Fig. 61. Formarea acidului citric.

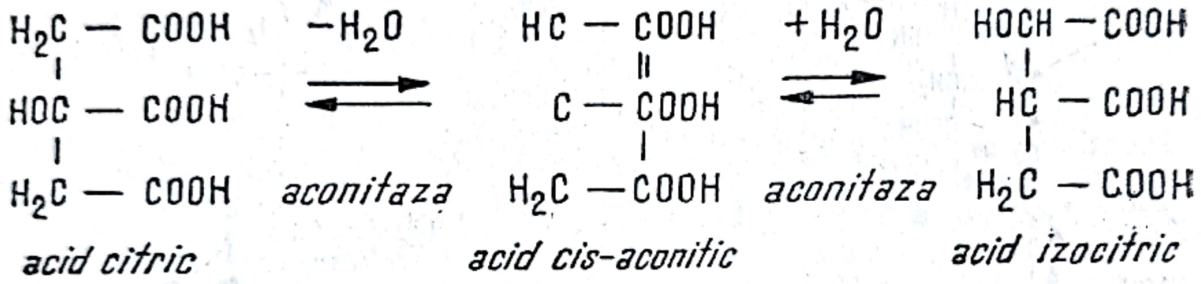


Fig. 62. Izomerizarea acidului citric.

posibilă formarea succinil ~ CoA, NAD reoxidînd mereu acidul lipoic transformîndu-se în NADH ; succinil-CoA se desacylează în prezența succinat-tiokinazei (fig. 64).

Succinil-CoA + GDP + P = CoA + acid succinic +GTP.

GTP în prezența ADP formează ATP, singura legătură bogată în energie care se formează la nivelul ciclului. Celelalte 11 legături au loc de-a lungul lanțului respirator, astfel : reoxidarea unei molecule de NADH dă naștere la trei ATP, iar reoxidarea unei molecule de $FADH_2$ la 2 ATP, așa că :

acid piruvic	⟶	acetil-CoA	3
acetil-CoA	⟶	acid citric	0
acid citric	⟶	acid izocitric	0
acid izocitric	⟶	acid α-cetoglutaric	3
acid α-cetoglutaric	⟶	succinil-CoA	3
succinil-CoA	⟶	acid succinic	1
acid succinic	⟶	acid fumaric	2
acid fumaric	⟶	acid malic	0
acid malic	⟶	acid oxaloacetic	3
			Total 15 mol. ATP

Scanned with OKEN Scanner

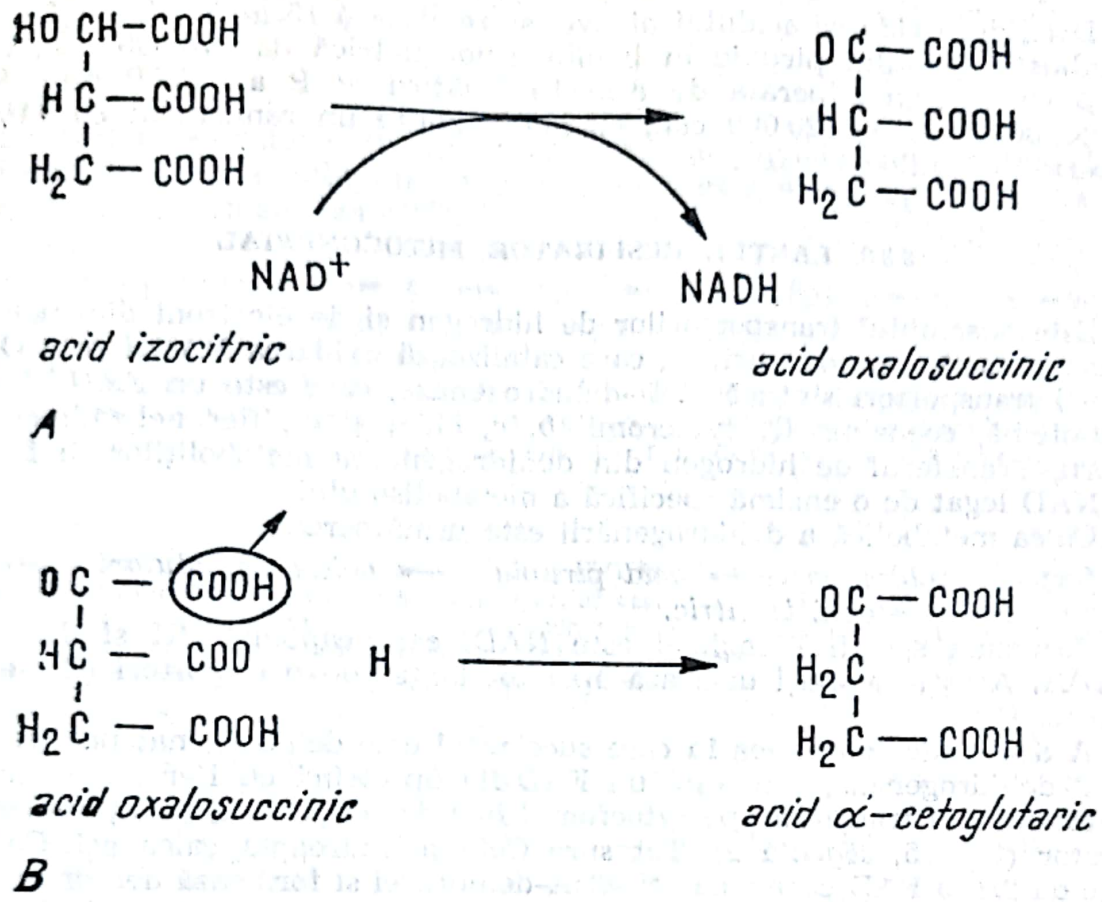


Fig. 63. A — dehidrogenarea acidului izocitric ; *B* — decarboxilarea acidului oxalosuccinic.

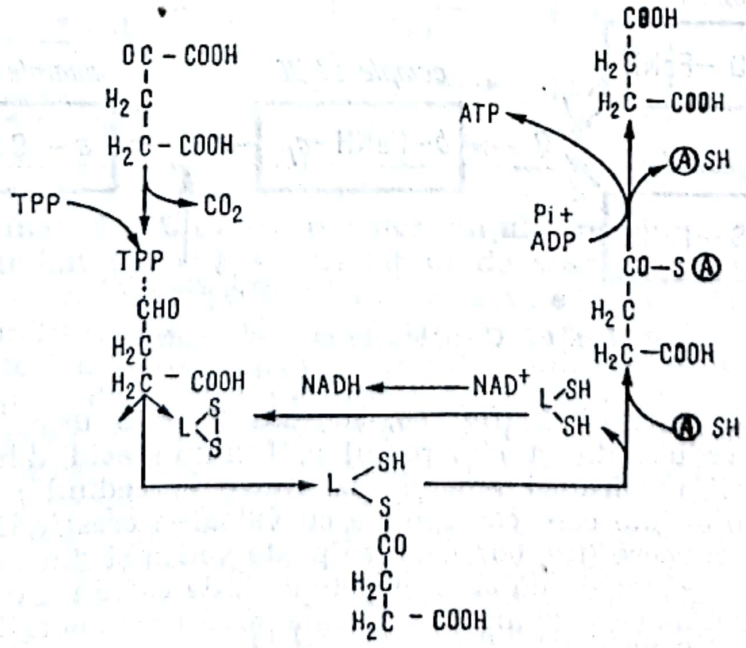


Fig. 64. Trecerea de la acid în C_5 în acizi în C_4.

Scanned with OKEN Scanner

Deci, din oxidarea acidului piruvic se realizează 15 molecule de ATP. Combustia acidului piruvic în bomba calorimetrică dă 274 000 cal., în timp ce energia eliberată de cele 15 legături ~ P ale ATP este de 15 × 8000 cal = 120 000 cal., cu alte cuvinte un randament cu 44% superior maşinilor termice.

3.3.3. LANŢUL RESPIRATOR MITOCONDRIAL

Este ansamblul transportorilor de hidrogen şi de electroni din membrana internă a mitocondriilor, care catalizează oxidarea NADH prin O_2. Aceşti transportori sînt : NADH-dehidrogenaza, care este un FMN [1]-flavoproteină, coenzima Q, cytocromii *b*, *c*, c_1, *a* şi a_3, fier neheminic şi cupru. Transferul de hidrogen din dehidrogenarea metaboliţilor se face pe NAD legat de o enzimă specifică a metabolismului.

Calea metabolică a dehidrogenării este următoarea :

fosfogliceraldehida ⟶ *acid piruvic* ⟶ *acid α-cetoglutaric* ⟶ *acid malic* ⟶ *acid izocitric.*

Coenzima specifică enzimei este NAD, care captează 2H şi devine NADH. Aceşti compuşi urmează apoi tot lanţul de transportori (fig. 65, *săgeata 1*).

A doua cale este aceea în care succinatul este dehidrogenat prin succinat-dehidrogenază, care este un FAD-flavoproteină cu fier neheminic. Electronii sînt transferaţi pe cytocromul-*b* şi de aci pe CoQ a lanţului respirator (fig. 65, *săgeata* 2). Tot spre CoQ se îndreaptă calea acil-CoA, care dă 2H la FAD-coenzima acil-CoA-dehidrazei şi formează dehidroacil-coenzima A. Şi tot spre CoQ merge şi calea acidului α-glicerofosforic, care are ca acceptor tot FAD.

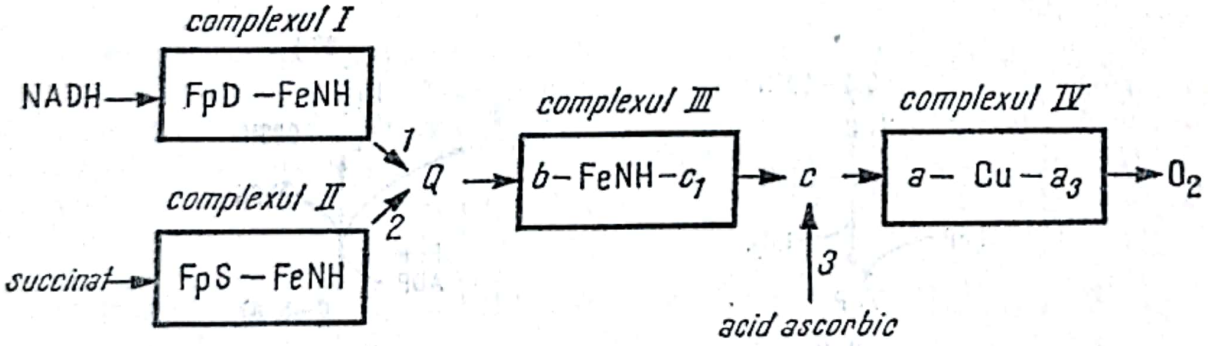


Fig. 65. Complexele mitocondriale.

O altă cale metabolică (fig. 65, *săgeata 3*) este urmată de acidul ascorbic care reduce direct citocromul *c*, formînd acid dihidroascorbic.

Transportorii respiratori reacţionează între ei cedînd sau acceptînd electroni într-o ordine care corespunde cu valoarea crescîndă a potenţialului de semi-reducere (fig. 66). Cum se poate vedea şi din tabelul 5, oxidarea unui transportor de un anumit potenţial, de către un transportor cu un potenţial mai mare, este însoţită de eliberarea unei energii libere (ΔG),

[1] ***FMN*** : flavinmononucleotid.

Scanned with OKEN Scanner

care este proporțională cu diferența (ΔE) dintre potențialele celor doi transportori, conform formulei :

$$\Delta G = -nf\Delta E,$$

în care f este echivalentul caloric al unui faraday, iar n — numărul de electroni. Energia eliberată în unele din aceste etape de oxidoreducere este suficientă în sinteza ATP.

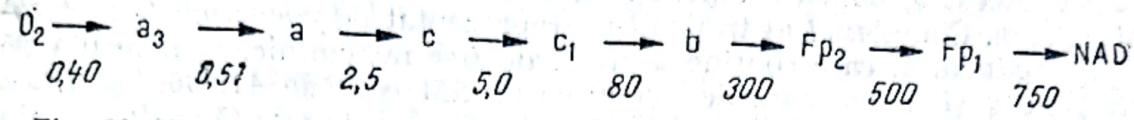


Fig. 66. Viteza de transfer a electronilor de-a lungul lanțului respirator. Numerele reprezintă semitimpii în milisecunde ai diferitelor transferuri de electroni dintre transportorii lanțului respirator (după Chance).

Tabelul 5

Relațiile dintre potențialele de semireducere (E′) la $pH = 7{,}3$ a unor transportori respiratori, diferențele dintre potențialele transportorilor vecini (Δ E′) și valorile de Δ G′ (variația energiei libere calculată la $pH = 7$, pentru concentrațiile molare ale substanțelor), pentru reacțiile de oxido-reducere dintre transportori (după Slater).

Cuplurile de transportori	E′ mV	ΔE′ mV	Δ G cal/mol.
$NAD_{red.} \rightleftharpoons NAD_{oxid.}$	−311		
		→ +400	−18 500
$CoQH_2 \rightleftharpoons CoQ$	+ 89		
Cyt · $b^{++} \rightleftharpoons$ Cyt · b^{+++}	+ 59	→ −30	+ 1 390
Cyt · $c^{++} \rightleftharpoons$ Cyt · c^{+++}	+260	→ +201	− 9 300
Cyt · $aa_3 \rightleftharpoons$ Cyt · aa_3^{+++}	+278	→ +18	− 850
$H_2O \rightleftharpoons \frac{1}{2}O_2$	+790	→ +512	−23 500

Analiza cinetică a oxido-reducerilor lanțului respirator. Aceasta a fost posibil de studiat datorită proprietăților de absorbție luminoasă sau de fluorescență a unor transportori. B. Chance și G. Williams au măsurat în milisecunde semitimpii necesari pentru oxidarea transportorilor respiratori dintr-o suspensie de mitocondrii în aerobioză parțială, la o temperatură de 25°C și o cantitate de $O_2 = 15$ μ M. Viteza de reacție variază în aceeași ordine ca și potențialul de semi-reducere.

Se constată că flavoproteinele au o viteză mică a fluxului de electroni, iar cytocromii au un flux rapid. Valorile omogene ale vitezelor de reacție dintre cytocromi sugerează că vibrațiile și rotațiile moleculare necesare transferului de electroni sînt realizate cu eficiențe egale la toți cytocromii.

Analiza enzimatică a lanțului respirator. A fost realizată de D. Green și T. King prin microdisecția chimică a mitocondriilor, în sensul tratării acestora cu detergenți tensioactivi sau cu alcooli superiori. Astfel,

Scanned with OKEN Scanner

s-au obținut 4 subunități ale lanțului respirator care conține transportorii electroni, o proteină de structură și lipide. Primul complex, denumit *NADH-coenzimă-Q-reductază*, este format dintr-o moleculă de FMN și din 8 atomi de fier „neheminic", are 1 170 000 GM, iar după delipidizare numai 750 000. El catalizează oxidarea NADH prin coenzima Q. Al doilea complex, *succinat-coenzima-Q-reductază*, conține o moleculă de FAD și 8 atomi de fier neheminic. GM a sa este de 340 000 și, după delipidizare, 220 000. Acest al doilea complex catalizează oxidarea succinatului tot cu ubiquinona. Complexul al treilea este reprezentat de *coenzima QH_2-citocrom-c-reductază*, care conține 2 atomi de fier neheminic, o moleculă de cytocrom-c_1 și 2 molecule de cytocrom-*b*. GM este de 418 000 și, după delipidizare, 268 000. El catalizează oxidarea coenzimei-Q redusă prin citocromul-c. Complexul al patrulea este *cytocrom-c-oxidaza*, format dintr-o moleculă de cytocrom-*a*, una a_3 și 2 atomi de cupru. GM este de 260 000, iar după delipidizare 166 000. Analizele au mers și mai departe, pentru a se cunoaște bine componentele acestor complexe.

Proteinele structurale, extractibile cu metode chimice „violente", care le pot denatura (?), reprezintă un procent de 50% din conținutul complexului. Ele au un punct izoelectric mare, de 10—11, polimerizează la *p*H-uri neutre sau se combină cu cytocromii și fosfolipidele, jucînd rolul de suport pe care se organizează secvențial transportorii.

În privința particulelor elementare ale lui Fernandez Morăn, acestea conțin ATP-aza necesară reacției finale a oxidării fosforilante. Fierul neheminic și cuprul trec reversibil din stare oxidată în stare redusă, iar vitezele cu care se oxidează și se reduc sînt acelea ale transportorilor de electroni din lanțul respirator. Grație rezonanței paramagnetice electronice s-a observat că fierul neheminic din complexul I are $g = 1{,}96$, din complexul II $g = 1{,}92$, din III $g = 1{,}90$, ceea ce indică trei feluri de compuși cu fier neheminic, bogați în cisteină și cu sulf labil, care servesc ca punct de unire între atomii de fier. În ceea ce privește potențialul de oxido-reducere al cuprului din complexul IV, el este între 284—274 mV, adică între semipotențialele de reducere ale cytocromilor-*a* (250 mV) și a_3 (300 mV).

Fosfolipidele mitocondriale contribuie și ele la organizarea macromoleculară a mitocondriilor, fiind suportul de fixare hidrofobă a citrocromilor și al coenzimelor lanțului respirator, organizînd complexele în sensul stabilității submicroscopice și funcționale și activează enzimele. De pildă, interiorul complexului III este ocupat de o proteină structurală pe care stau în proporții definite fosfolipidele și de ele sînt legați cytocromii-*b* și *c*, proteina nehemică și proteina care cuplează inhibitorii, separarea uneia din acestea din complex ducînd la inactivarea lui. S-a mai precizat că flavoproteinele respiratorii din complexul I sînt de două feluri : $F_p D_1$, cu un potențial de oxido-reducere de —230 mV și $F_p D_2$, cu —120 mV la $pH=7$.

Se pune întrebarea : există sau nu interacțiuni între componenții unui lanț respirator cu aceia ai lanțurilor vecine ? Pentru Green lanțul respirator este organizat în complexe multimoleculare, iar în cadrul fiecărui complex determinat electronii sînt transferați succesiv prin componenții aceluiași complex, fără să aibă loc vreo interacțiune cu alți compuși omologi de la exterior. În opoziție cu această concepție, B. Chance consideră în cadrul teoriei oxizomului că transportorii sînt repartizați statistic

Scanned with OKEN Scanner

în membrana internă a mitocondriei, așa că posibilitatea interacțiunii între ei crește în funcție de potențialul oxido-reducător : electronii unui transportor redus vor fi transferați mai ales transportorului cu potențialul oxido-reducător cel mai apropiat.

Dealtfel, trebuie luat în considerație și caracterului alotropic al acestor transportori. Așa, de pildă, succinat-dehidrogenaza mitocondrială este inhibată cu trifluorotienil-butanodionă (TTB), astfel că succinatul nu se mai oxidează. În schimb, enzima solubilă nu este inhibată de TTB. Dacă se amestecă o proteină de structură, fosfolipide, coenzima-Q și cytocromul-*b* cu succinat-dehidrogenaza, în soluție, se constată o activitate succinat-coenzima-Q-reductazică sensibilă la TTB. Cytocromul-*b* intervine în acest caz și ca transportor de electroni și ca element structural. Tratat cu dodecilsulfat de sodiu care-i suprimă rolul de transportor, cytocromul-*b* rămîne totuși o componentă indispensabilă — structurală — a reducerii coenzimei-Q de către succinat (fig. 67 și tab. 6).

Tabelul 6

Greutățile particulelor complexelor transportoare de electroni, componentele și enzimele asociate lor (1 d a l t o n = greutatea unui atom de hidrogen)

Componentele	Enzimele asociate	Greutatea particulelor
Complexul I (proteine cu Fe neheminic, proteine de structură, flavine extrase cu acizi, lipide).	mitocondrii din inimă de bou	117×10^4 daltoni
Complexul II (proteine cu Fe nehem., cyt. *b*, flavine extrase cu acizi, lipide)	mitocondrii din inimă de bou	20×10^4
Complexul III (proteine cu Fe nehem., cyt. *b*, cyt. *c*, proteine centrale, lipide)	mitocondrii din inimă de bou	30×10^4
Complexul IV (cyt. *a*, a_3, proteine, lipide)	mitocondrii din inimă de bou	$26-36\times10^4$
Cyt, *a* monomer	inimă de bou	$7{,}2\times10^4$
Cyt. *c*	inimă de cal	$1{,}2\times10^4$
Cyt. c_1	inimă de bou	$3{,}6-3{,}8\times10^4$
Cyt. *b*	inimă de bou	$2-2{,}8\times10^4$
Proteine cu Fe nehem.	inimă de bou	$2{,}5-3\times10^4$
Proteinele miezului	complexul III	$4-5\times10^4$
Proteinele structurale	complexul III	$2{,}2\times10^4$
Proteinele cu cupru	complexul IV	$1{,}2\times10^4$
NADH-dehidrogenază	complexul IV	$7{,}8\times10^4$
Succinat-dehidrogenază	complexul IV	$2-3\times10^4$

Scanned with OKEN Scanner

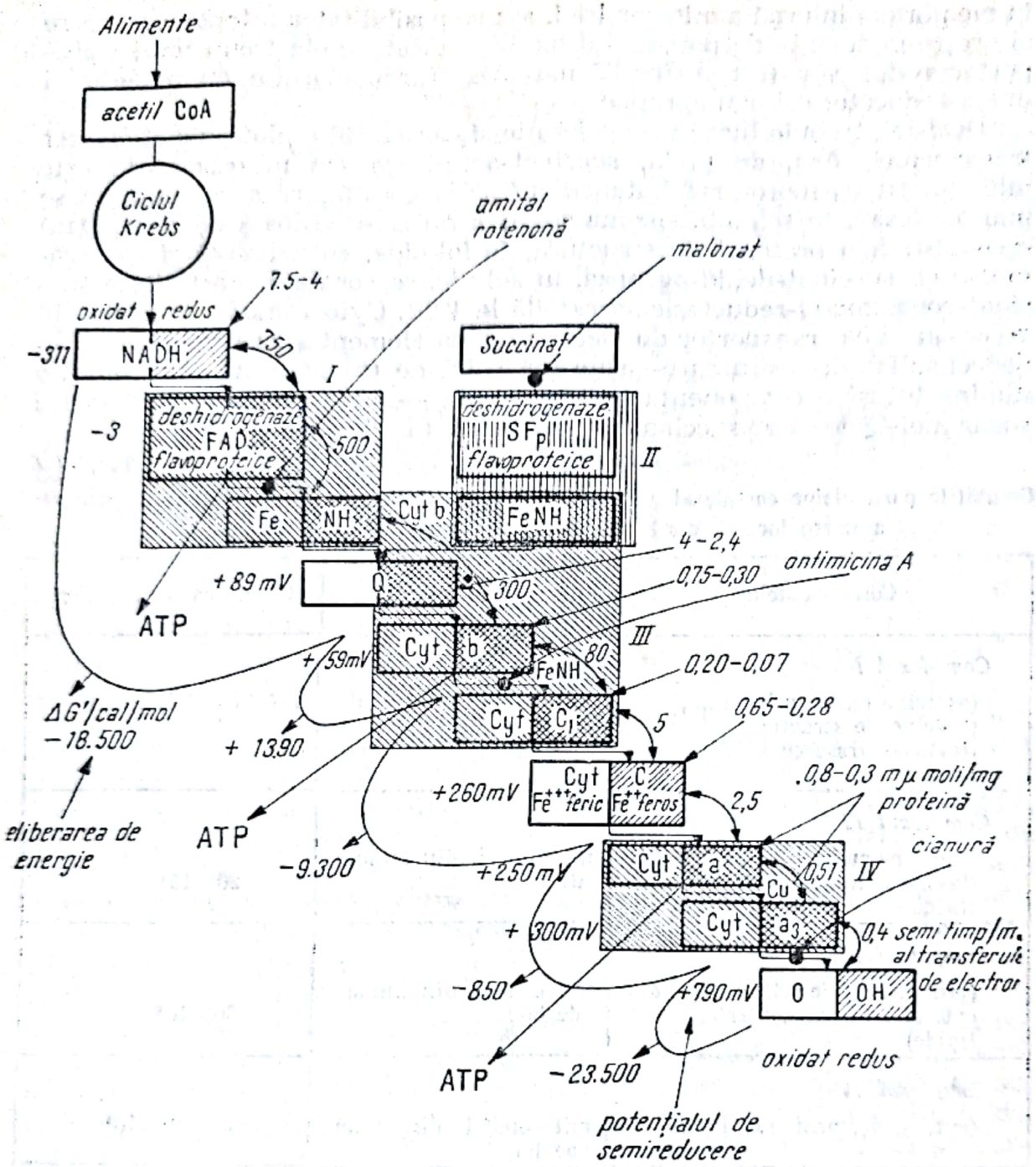


Fig. 67. Lanțul respirator și sitele formării ATP.

Lanțul respirator se poate compara cu o scară pe ale cărei trepte stă cîte un individ care primește o încărcătură de la altul de pe treapta superioară și o transmite următorului de pe treapta inferioară. În cazul lanțului respirator sarcinile sînt protonii și electronii, atașați la alimente în timpul ultimei etape a oxidării lor în cadrul ciclurilor Krebs și Lynen. Cînd primul transportor FAD este în stare oxidată el acceptă ionii de hidrogen și electronii, reducîndu-se și apoi îi transmite următorului transportor oxidîndu-se, așa încît din aproape în aproape, prin trecerea transportorilor de la un stadiu oxidat la unul redus, protonii și electronii ajung la oxigenul provenit din aer pe care-l activează, iar după ce se activează și hidrogenul se formează apa. Lanțul respirator pleacă de la un transportor NAD cu un potențial de oxido-reducere $e = -310$ mV și se termină la un protențial de +790 mV. De trei ori în cadrul lanțului, diferențele de potențial dintre transportori permit sinteza unei legături bogate în energie, stocată sub forma moleculei de ATP.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.4. CUPLAREA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE CU SINTEZA ATP

Oxidarea fosforilantă depinde de structura membranară a mitocondriilor, care sînt capabile să producă, să acumuleze și să transforme energia sub trei forme echivalente :

— energie de oxido-reducere (~e) ;
— energie de transfer al grupării fosfatice (~*P*) ;
— energie osmotică (~*i*).

Cu alte cuvinte, în mitocondrii transferurile de electroni sînt reversibile, deoarece poate rezulta un reflux de electroni din energia liberată prin hidroliza ATP în ADP și ~ P ; în mod continuu mitocondriile sintetizează ATP, transportînd și acumulînd în același timp cationii bivalenți în ele. Energia se acumulează în mitocondrii sub formă chimică, ca ATP, sau ca putere reducătoare NAD, sau sub forma altor compuși capabili să-și transfere electronii sau H^+. Energia se mai poate acumula și sub forma unui gradient chimic :

$\sim e \longrightarrow \sim P$ (oxidarea fosforilantă) ;
$\sim e \longrightarrow \sim i$ (acumularea de ioni folosindu-se energie de oxido-reducere) ;
$\sim P \longrightarrow \sim i$ (acumularea de ioni folosindu-se energia dată de ATP) ;
$\sim i \longrightarrow \sim P$ (sinteza de ATP folosindu-se energia unui gradient ionic) ;
$\sim i \longrightarrow \sim e$ (flux endergonic de electroni într-un lanț respirator, care folosește energia unui gradient ionic) ;
$\sim P \longrightarrow \sim e$ (flux endergonic de electroni într-un lanț respirator, care folosește energia ATP).

Cunoscînd viteza respirației unui preparat de mitocondrii și a cantității de ATP formată prin fosforilarea ADP, putem calcula cuplajul respirației cu sinteza ATP. În practică se măsoară cu respirometrul Warburg o suspensie de mitocondrii în mediul izotonic, avînd piruvat ca material de combustie, ortofosfat, ADP și Mg^{++}. Se apreciază consumul de O_2, după care se blochează respirația și se dozează fie ATP format, fie PO_4 consumat. ATP, de fapt, este captat de la început printr-un amestec de glucoză și hexokinază, care generează ADP și glucozo-6-fosfat dozabil.

Ortofosfatul poate fi radioactiv (^{32}P), așa că se măsoară fosforilarea ca raport $\frac{P}{O}$ al cantității de fosfat folosit pentru sinteza unor μ moli de ATP, raportată la o cantitate de μ atomi/g de oxigen consumat.

Valoarea raportului $\frac{P}{O}$ a oxidării β-hidroxibutiratului cu NAD-dehidrogenaza este 3, a oxidării succinatului care cedează electronii cytocromului-*b* este 2, iar a oxidării ascorbatului care cedează electronii la nivelul cytocromului-*c* este 1. Lanțul respirator prezintă trei site de transferuri exergonice de electroni la nivelul cărora are loc cuplarea ADP cu P în ATP (fig. 68) : primul este între NAD și CoQ, al doilea între cytocromul-b și *c*, și al treilea în cursul oxidării cytocromului a_3 de către O_2.

Scanned with OKEN Scanner

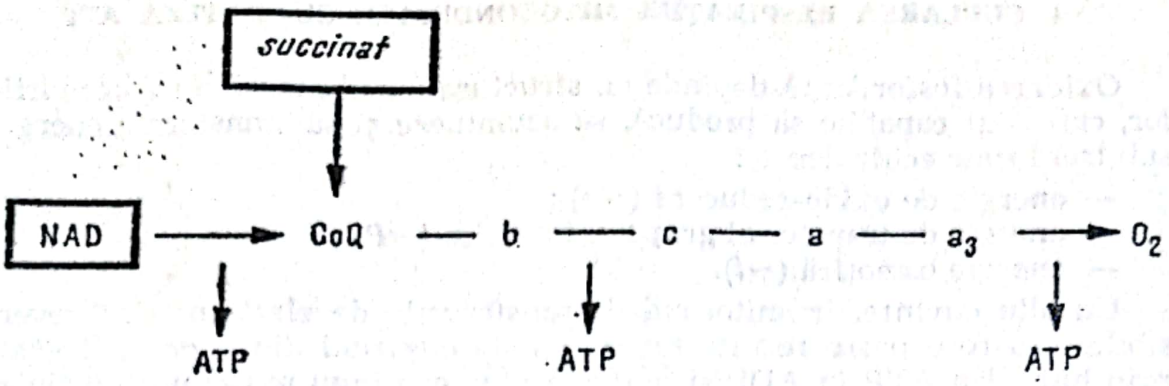


Fig. 68. Localizarea „sitelor" fosforilării în lanțul respirator mitocondrial.

Respirația este controlată, deoarece potențialitatea respiratorie a mitocondriilor nu se manifestă decît parțial. Aceasta poate fi dovedită luînd o suspensie de mitocondrii incubate într-un mediu izotonic neutru cu *p*H = 7,4, care conține P_i [1], Mg^{++} și piruvat. Suspensia respiră foarte încet, cu toate că există toate condițiile ca să oxideze substratul pînă la $CO_2 + H_2O$. Dacă adăugăm în mediul izotonic o cantitate limită de ADP are loc o stimulare imediată, dar temporară, a respirației pînă ce tot ADP adăugat se transformă în ATP (fig. 69). Rezultă că transformarea ADP în ATP este foarte strict cuplată cu stimularea respirației. Calculîndu-se raportul $\frac{ADP}{O}$, în care ADP sînt exprimați în μM adăugați iar O reprezintă μ atomii gram consumați după adausul de ADP, aflăm cîtul fosforilării. Raportul dintre viteza respirației stimulată și a respirației controlată este *indicele controlului respirator*.

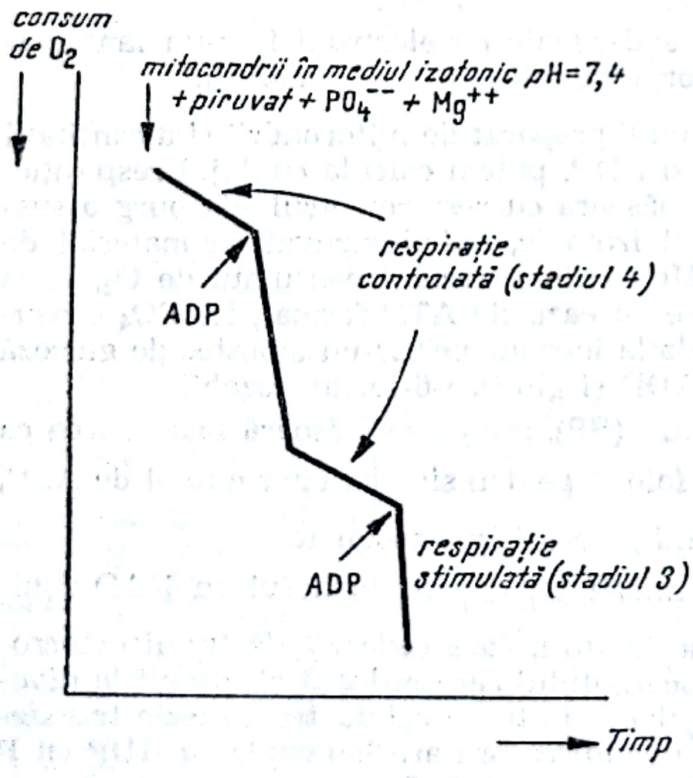


Fig. 69. Efectul ADP asupra unei respirații controlate.

B. Chance a observat că stimularea respirației cu ADP este corespunzătoare unei variații a potențialului de oxidoreducere a transportorilor. El a stabilit 5 stadii :

— *stadiul I*, în care toți transportorii sînt oxidați ;

— *stadiul II*, în care transportorii sînt oxidați dar crește ADP ;

— *stadiul III*, de respirație stimulată ;

— *stadiul IV*, de respirație controlată ;

— *stadiul V*, în care toți transportorii sînt reduși (anaerobioză).

[1] P_i = fosfat anorganic

Scanned with OKEN Scanner

Tot B. Chance a stabilit o zonă de tranziție de-a lungul lanțului respirator, în care se conservă energia. Într-adevăr, în experiențele de control respirator descrise mai înainte, atunci cînd mitocondriile cu respirație controlată (stadiul IV) sînt stimulate (stadiul III) toți transportorii se reoxidează afară de cytocromii-*a* și a_3 care devin mai reduși. Deci zona de tranziție se află între cytocromul-*c* și cytocromii-*a*, a_3 și aici are loc inversarea schimbărilor normale de oxido-reducere a transportorilor. Antimicina A adăugat la o suspensie mitocondrială creează o zonă de tranziție artificială : de la „situsul" de acțiune a antimicinei la NAD transportorii sînt reduși, iar transportorii de la „situsul" antimicinei la oxigen sînt oxidați. Tot astfel, în mod normal, lipsa ADP creează o inhibiție la nivelul unor transportori care se transformă în derivați ce nu mai pot realiza transferul electronilor. Dacă sînt doi transportori, unul oxidat *B* și altul redus AH_2 Chance și Williams consideră că energia eliberată în cursul oxidării AH_2 de B creează un derivat $A\sim I$, în care *I* reprezintă un compus ipotetic de natură mitocondrială :

$$AH_2 + B + I \rightleftharpoons A\sim I + BH_2.$$

Derivatul $A\sim I$ nu poate să mai accepte hidrogeni de la alți transportori cu potențial mai scăzut, iar forma *A* este în schimb repede redusă de AH_2. Tocmai energia acumulată în $A\sim I$ servește la sinteza ATP, astfel :

$$A\sim I + P + ADP = A + I + ATP.$$

Sinteza ATP apare drept una din condițiile necesare ca mitocondriile să respire în toată plenitudinea lor structurală, energia eliberată dintr-o reacție de oxidoreducere fiind înmagazinată în ATP (fig. 70).

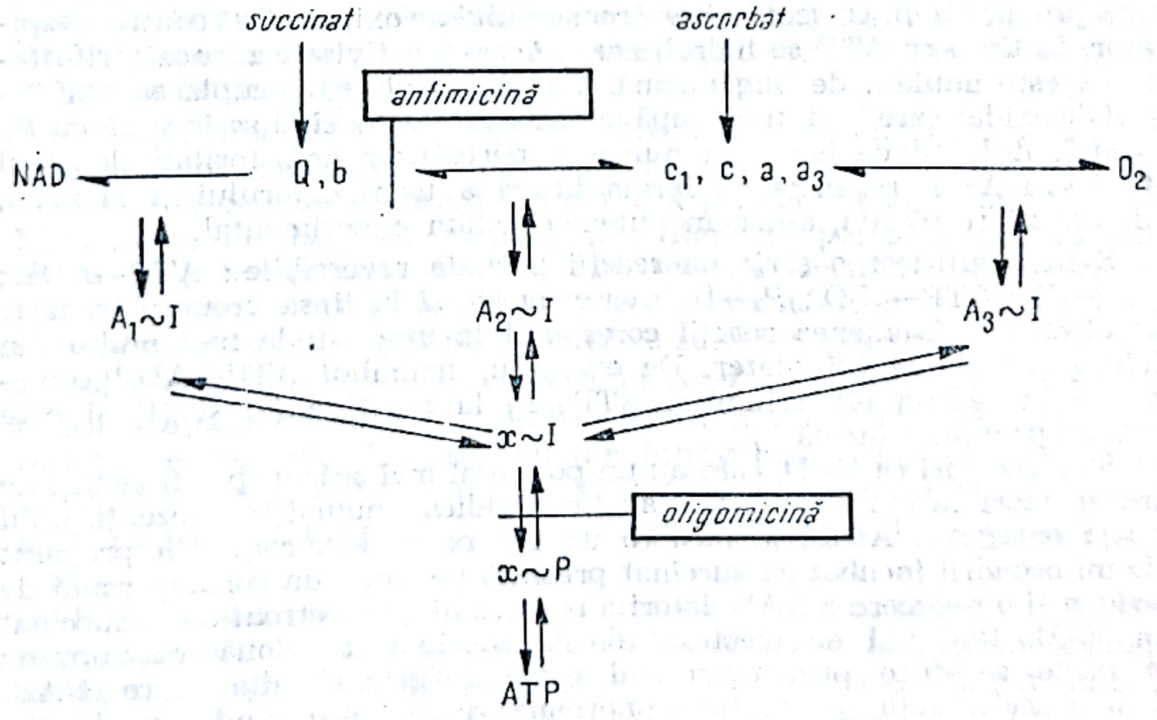


Fig. 70. Reversibilitatea de electroni din lanțul respirator, după concepția lui L. Ernster.

Teoria chimică a oxidării fosforilante. A fost enunţată încă din 1953 de E. Slater, bazîndu-se pe conceptul transformării energiei de oxido-reducere în legătură de înalt potenţial energetic. În teoria chimică, conversia energiei în ATP are loc în trei „situsuri" din lanţul respirator. În fiecare situs, reacţiile care se petrec între doi transportori de electroni produc ATP şi o moleculă de apă, energia liberă fiind de 7500 cal. la $pH = 5$.

$$AH_2 + B + I \rightleftharpoons A \sim I + BH_2 \quad (1)$$

A (redus), B (oxidat)

$$A \sim I + X \rightleftharpoons X \sim I + A \quad (2)$$

$$X \sim I + P \rightleftharpoons P \sim I + X \quad (3$$

$$P \sim I + \text{ADP} \rightleftharpoons I + \text{ATP} \quad (4)$$

În reacţia (1) se formează un derivat bogat în energie la nivelul unuia dintre transportorii de electroni care păstrează energia oxido-reducătoare a lanţului. Un compus mitocondrial I preia legătura cu înalt potenţial energetic $\sim$; cînd AH_2 este oxidat de B, se leagă de A astfel :

$$AH_2 + B + I \rightleftharpoons A \sim I + BH_2.$$

Astfel de derivaţi intermediari ($X \sim I$, $\sim P \sim I$) şi ATP bogaţi în energie se formează tot prin transfer de energie şi în cadrul reacţiilor (2), (3) şi (4). Adausul de oligomicină la un preparat mitocondrial (în soluţie izoosmotică cu piruvat, P_i şi Mg^{++}) blochează sinteza ATP iar respiraţia nu mai poate fi stimulată cu ADP. Dar dacă adăugăm un decuplant al fosforilării oxidante, de exemplu 2,4-dinitrofenol, acesta stimulează respiraţia preparatului, crescînd viteza consumului de oxigen, fără control respirator, în timp ce ATP se hidrolizează. Această activitate adenozintrifosfatazică este anulată de oligomicină. Cu alte cuvinte, decuplarea fosforilării de oxidare are loc într-o etapă anterioară aceleia cînd se încarcă cu P_i. Decuplantul induce hidroliza numai a derivaţilor nefosforilaţi de tipul $A \sim I$ sau $X \sim I$, regenerează forma liberă a transportorului A şi, deci, stimulează respiraţia, aşa cum putem constata experimental.

S-au identificat o serie de reacţii parţiale reversibile : ATP—ADP ; ATP—P_i ; ATP—H_2O ; P_i—H_2O care au loc şi în lipsa vreunui transfer de electroni. Asemenea reacţii corespund la una sau la mai multe din *cele 4 reacţii ale lui Slater*. De exemplu, schimbul ATP—ADP corespunde la reacţia (4), schimbul ATP—P_i la reacţiile (3) şi (4) şi este inhibat prin oligomicină.

Transportori ca NAD, care au un potenţial mai scăzut, pot fi reduşi de transportori ca cyt.*b*. cu potenţialul mai ridicat, numai în prezenţa unui aport energetic. Astfel ia naştere un reflux de electroni. Un preparat de mitocondrii incubat cu succinat prezintă pe lîngă un consum rapid de oxigen şi o reducere a NAD datorită refluxului de electroni de la succinat la NAD. Refluxul de electroni de la succinat ia două căi opuse : o parte se duce prin cytocromi către oxigen şi alta către NAD. Prima cale este o evoluţie normală care corespunde unei eliberări de energie, a doua este un reflux de electroni care necesită un aport energetic. Acest aport energetic este dat de oxidarea succinatului

Scanned with OKEN Scanner

și provine din derivați nefosforilați. Într-adevăr, NAD nu este inhibat de oligomicină care însă acționează inhibitor asupra derivatului fosforilat *P~I* (fig. 71).

Dacă se adaugă la mitocondrii antimicina A și apoi succinat, nu mai are loc reducerea NAD mitocondrial. Antimicina A blochează oxidarea succinatului la nivelul cytocromului-*b* (primul transportor succinat $\rightarrow O_2$). În această situație nu există nici o energie disponibilă refluxului de electroni de la succinat la NAD. Dacă se adaugă ATP preparatului respectiv,

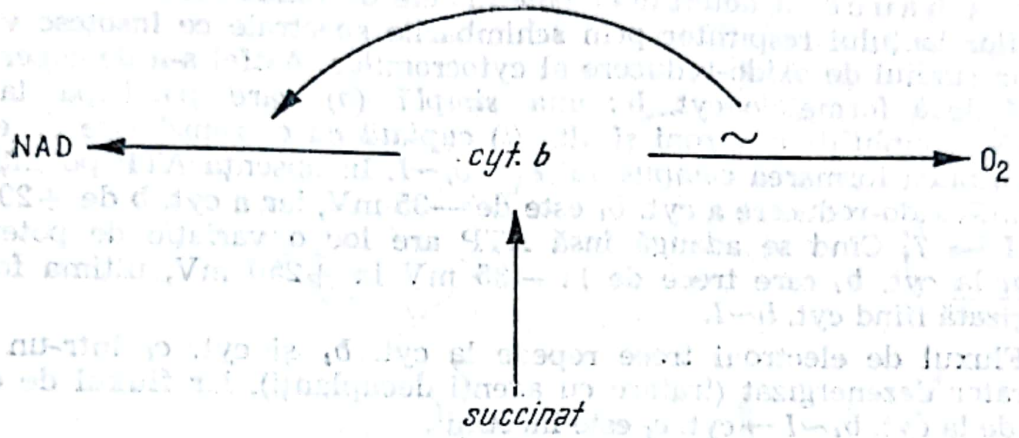


Fig. 71. Refluxul endergonic al electronilor de la succinat la NAD care necesită energie. Energia rezultă din oxidarea succinatului (după P. Vignais).

bineînțeles că NAD se reduce și reacția este blocată de oligomicină. Deci refluxul de electroni folosește ca sursă energetică fie derivați nefosforilați cu potențial energetic înalt, fie ATP, așa că oxidarea fosforilantă este un proces reversibil (fig. 71).

Energia eliberată prin oxido-reducere într-o anumită regiune a lanțului respirator este păstrată și folosită chiar în prezența oligomicinei, servind la refluxul de electroni dintr-o altă porțiune a lanțului respirator. Mitocondrii incubate cu succinat și antimicină pot să-și reducă NAD numai în prezența unui ascorbat care cedează electronii săi cytocromului-c. Acesta din urmă este oxidat de cytocromul-*a*, a_3 și energia rezultată servește la reducerea NAD de către succinat. Asemenea rezultate au postulat existența unui derivat comun *X~I* celor trei etape ale fosforilării lanțului respirator. Energia derivatului comun este folosită în refluxul endergonic de electronii din întreg lanțul (fig. 71). *X~I* reacționează cu ortofosfatul și nu cu ADP. S-a putut dovedi că puntea *O* a grupării pirofosfat terminale din ATP provine din ADP și nu din ortofosfat.

S. Muraoka și E. Slater au mai arătat că starea de reducere a transportorilor respiratori crește cu concentrația în substrat oxidabil adăugat unui preparat mitocondrial în stadiul III (cu ADP), dar nu și în stadiul IV (fără ADP). Prin inhibiția cyt.-oxidazei cu azidă de Na se încetinește respirația în stadiul III dar nu și în IV ; la fel și cu oligomicină, care este inhibitor al fosforilării. Cu alte cuvinte, în stadiul III lanțul

Scanned with OKEN Scanner

respirator se află într-un stadiu de oxido-reducere a transportorilor de electroni, care depinde de fluxul de hidrogen de la ciclul Krebs la NAD, dar și de activitatea cytocrom-oxidazei. Deci starea de oxido-reducere este reglată cinetic prin cele două capete : cel cu NAD-dehidrogenaze și cel cu oxigen. În stadiul IV, transportorii de electroni ai lanțului respirator se află într-un *echilibru termodinamic* cu ADP, ATP și P_i. Constanta globală a acestui echilibru este 1, ceea ce înseamnă că energia liberă a hidrolizei derivaților $A\sim I$, $P\sim I$, $X\sim I$ este la fel cu aceea a ATP.

B. Chance a determinat potențialele de oxido-reducere ale cytocromilor lanțului respirator prin schimbările spectrale ce însoțesc variațiile în stadiul de oxido-reducere al cytocromilor. Astfel s-a descoperit că există două forme de cyt. *b* : una *simplă* (*b*) care participă la un transfer simplu de electroni și alta (*t*) *cuplată* cu o transducție de energie, de pildă formarea compusului cyt. $b_t\sim I$. În absența ATP potențialul de semi-oxido-reducere a cyt. b_t este de —35 mV, iar a cyt. *b* de +20 mV la *p*H = 7. Cînd se adaugă însă ATP are loc o variație de potențial *numai* la cyt. b_t care trece de la —35 mV la +250 mV, ultima formă energizată fiind cyt. $b\sim I$.

Fluxul de electroni trece repede la cyt. b_t și cyt. c_1 într-un lanț respirator dezenergizat (tratare cu agenți decuplanți), iar fluxul de electroni de la cyt. $b_t\sim I \rightarrow$ cyt. c_1 este încetinit.

E. Racker a reușit să rupă mecanic mitocondriile, obținînd vezicule membranare cu particule elementare pe ele. Acestea au fost izolate prin ultracentrifugare, iar în supernatant lichid (*S*) au rămas proteinele solubile matriceale. Particulele *P* cu enzimele lanțului respirator nu pot cupla respirația cu producerea ATP decît în prezența lichidului *S*. Deci, s-a putut disocia respirația de fosforilare. Din supernatantul *S* s-a izolat un *factor* F_1 care cuplează oxidarea cu fosforilarea, și care este format din două subunități cu GM 284 000. El hidrolizează soluția ATP în ADP. Această proprietate se pierde dacă factorul stă mai mult timp la 0°C. Factorul F_1 este insensibil la oligomicină. Dar ce-ar putea face pe F_1 sensibil la oligomicină ? Racker s-a întrebat dacă nu cumva vreun compus mitocondrial. Și pentru a-l descoperi a purificat de orice activitate ATP-azică particulele *P* (prin digestia cu tripsină, urmată de incubație la 0°C cu uree, el a obținut particule submitocondriale *TU*, sau prin trecerea pe coloană de Sephadex urmată de incubare cu uree la 0°C, cînd a obținut particule *SU*). La asocierea particulelor *TU* sau *SU* cu factorul F_1, acesta din urmă capătă o activitate ATP-azică sensibilă la oligomicină și stabilă la 0°C. Este, deci, un fenomen de alotropie. Particulele *SU* sau *TU* examinate la microscopul electronic apar ca niște vezicule obișnuite, însă cuplate cu factorul F_1 se organizează în particule submitocondriale acoperite de particule elementare. ATP-aza fixată pe membrană are proprietăți deosebite de aceea liberă.

Școala lui Racker a mai descoperit o serie de *factori de cuplaj*: F_2, F_3 F_4, F_5, dintre care F_4 este o proteină de structură pe care se fixează transportorii lanțului respirator și factorii de cuplaj ai transformării energiei respiratorii în ATP.

E. Slater (1975) a propus o ipoteză după care ATP-aza, care catalizează sinteza ATP legată de transferul de electroni, există sub două

Scanned with OKEN Scanner

configurații, una *deschisă* și alta *închisă*. Configurația deschisă se leagă de aurovertină producîndu-se o fluorescență intensă ; configurația deschisă poate lega (prin F_1) ADP și P_i la „situsurile" catalitice. Rezultă o dehidrare cu formarea ATP în configurație deschisă, care se transformă brusc într-una închisă. În cadrul acesteia ATP este mai strîns legat. Dar transferul de electroni deschide configurația închisă eliberînd ATP, dar „deschizînd" ATP-aza are loc o disociere de ATP și legarea ADP și P_i mai strîns ca în stadiul închis (fig. 72).

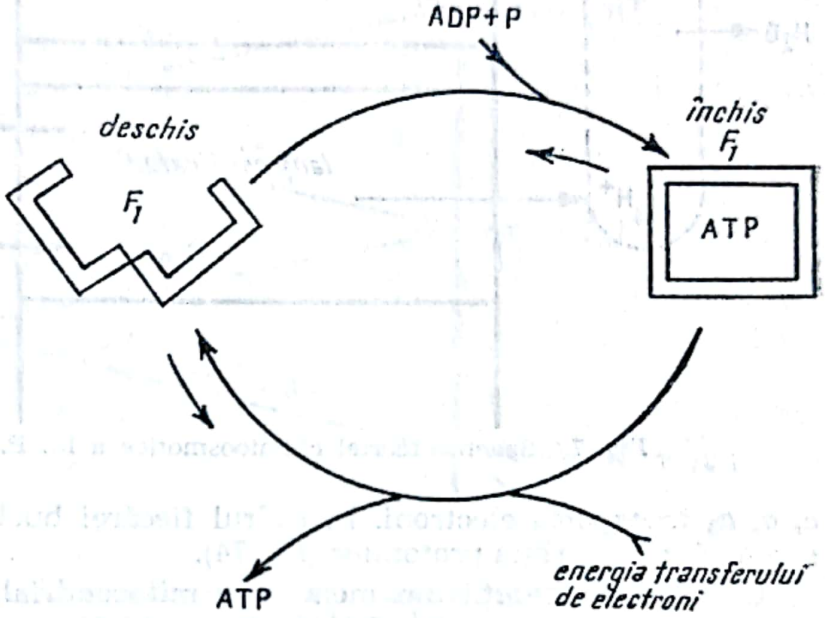


Fig. 72. Concepția lui Slater asupra catalizării ATP de către ATP-ază.

Teoria chimioosmotică. Această teorie a fost formulată de P. Mitchell, care consideră că energia eliberată de către fluxul de electroni din lanțul respirator servește la separarea protonilor și electronilor de fiecare parte a membranei interne mitocondriale. În acest fel se formează un gradient de ioni H^+ (sau H_3O^+), care are o forță proton-motoare ce servește sistemului ATP-ază—ATP-sintetază să genereze ATP (fig. 73). Din figură rezultă cum în membrana internă a mitocondriilor există o activitate selectivă de transfer din matrice a protonilor proveniți din lanțul respirator, prin membrana internă și apoi la exterior. Pe măsură ce scade concentrația protonilor în matrice crește concentrația în $—OH^-$ din ea.

Energia translocării protonilor este dată de transferul electronilor de-a lungul lanțului respirator. După cum s-a arătat, membrana internă a mitocondriilor conține o stare alotropică de ATP-ază care poate funcționa și ca sintetază. În timpul sintezei $ADP + P \rightleftharpoons ATP + H^+ + OH^-$, ionii de H^+ sînt eliminați în interior iar cei de OH la exteriorul membranei mitocondriale, fiecare dînd apă cu ionii OH^- și H^+ formați și eliminați în cadrul lanțului respirator.

Mitchell concepe lanțul respirator ca fiind format din 3 bucle de transportori, fiecare din ele fiind, de fapt, un loc de cuplare cu fosforilarea. NAD, FMN și CoQ transportă H^+, în timp ce FeNH, cyt. *b*, cyt. c_1,

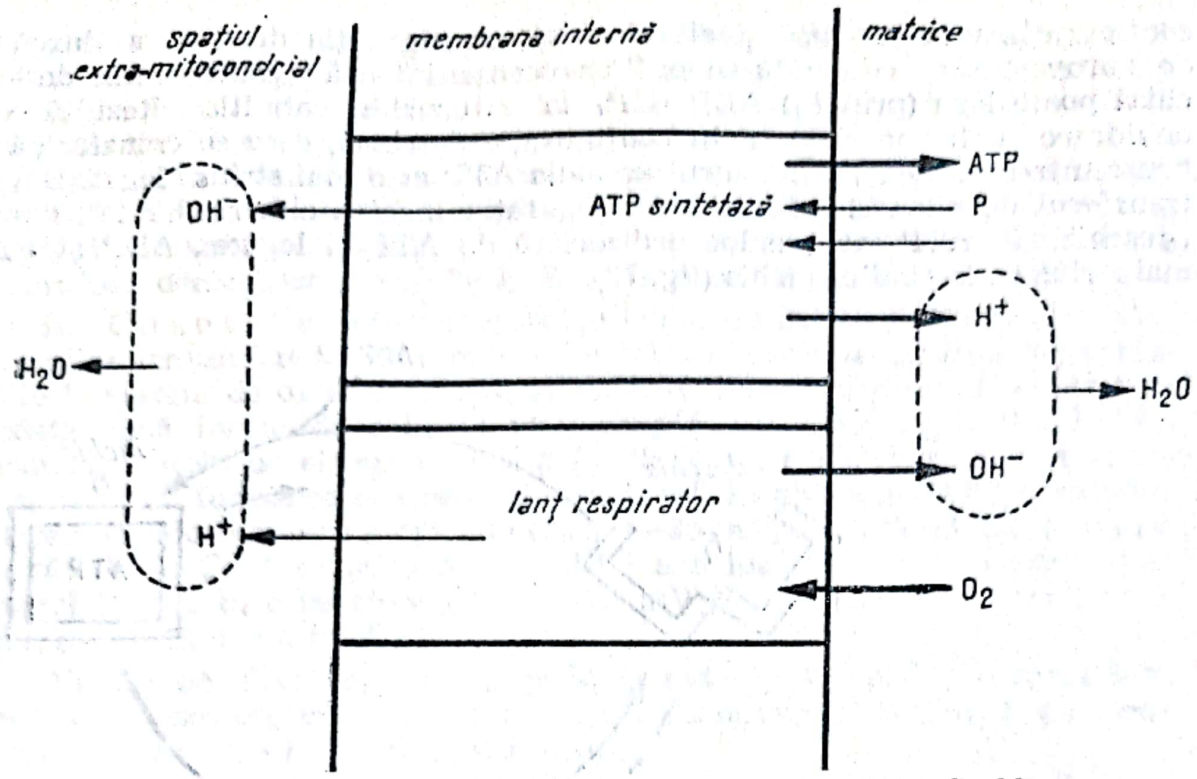


Fig. 73. Schema teoriei chimioosmotice a lui P. Mitchell.

c, *a*, a_3 transportă electroni. În cadrul fiecărei bucle are loc atît producerea, cît și absorbția protonilor (fig. 74).

Următoarele reacții din membrana mitocondrială eliberează protoni :

$NADH + H^+ + 2Fe — NH_{ox} \rightarrow NAD^+ + 2Fe — NH + 2H^+$ (prima buclă);

$FMNH_2 + 2$ cyt $b^{+++} \rightarrow FMN + 2$ cyt. $b^{++} + 2H^+$ (a doua buclă);

$CoQH_2 + 2$ cyt $\cdot c^{+++} \rightarrow CoQ + 2$ cyt $\cdot c^{++} + 2H^+$ (a treia buclă).

Reacțiile care urmează absorb protonii:

$FMN + 2H^+ + 2Fe — NH \rightarrow FMNH_2 + 2Fe — NH_{ox}$ (prima buclă);

$CoQ + 2H^+ + 2$ cyt. $b^{++} \rightarrow CoQH_2 +$ cyt. b^{+++} (a doua buclă);

$2H^+ + \frac{1}{3}O_2 + 2$ cyt. $a_3{}^{++} \rightarrow H_2O + 2$ cyt. $a_3{}^{+++}$ (a treia buclă).

În fiecare buclă de oxido-reducere are loc o trecere de protoni din matrice în afara mitocondriilor, astfel că în cursul oxidării unei molecule de NADH de către O_2 trec $6H^+$. Deci, transferul de protoni realizat în cursul oxidării substratului dezvoltă o „*forță proton-motoare*“ datorită căreia este posibilă sinteza ATP, după reacția :

$$ADP + \text{fosfat} + 2H^+_{ext.} \rightarrow ATP + H_2O + 2H^+_{int.},$$

de unde se poate deduce :

$$\frac{[ATP]}{[ADP]} = \frac{[P]}{K[H_2O]} \cdot \frac{[H^+]^2_{ext.}}{[H^+]^2_{int.}},$$

$$\text{de unde: } \log. \frac{[ATP]}{[ADP][P]} = -\log. K[H_2O] + \frac{[H^+]_{ext.}}{[H^+]_{int.}}$$

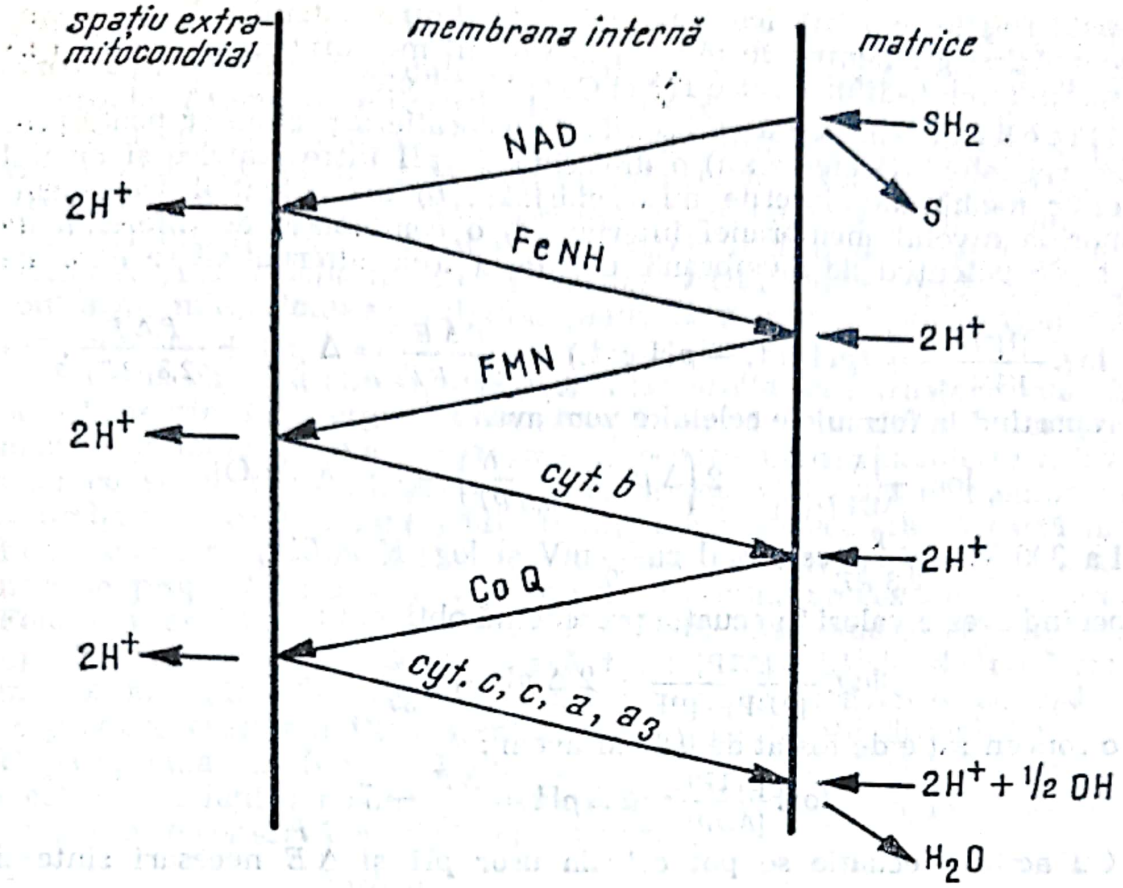


Fig. 74. Buclele de oxidoreducere ce dau naștere unui gradient de protoni (după Mitchell).

Dacă nu se ia în considerație potențialul de membrană, $\log. \frac{[H^+]_{ext.}}{[H^+]_{int.}}$ este egal prin definiție cu *p*Hint. — *p*Hext.

Oxidarea NADH în lanțul respirator dă naștere la un gradient de protoni și la un potențial transmembranar. Măsurîndu-se cu microelectrozi potențialul membranelor mitocondriale (stadiul III) de *Drosophila*, s-a găsit că acesta este de 20 mV. Acest potențial nu poate folosi la sinteza ATP care are loc numai la o diferență de *p*H de peste 3,5 unități între matrice și spațiul extramitocondrial. Potențialul transmembranar este în relație indirectă cu translocarea protonilor de către sisteme de schimburi-difuzie cu cationii Ca^{++}, Mg^{++}, K^+.

Termodinamic, echilibrul protonic al membranelor se exprimă prin ecuația :

$$\Delta G = -nF \cdot \Delta E = -2{,}3\, RT \times \frac{[H^+]^2_{ext.}}{[H^+]^2_{int.}},$$

unde $n = 1$ și ΔE este diferența de potențial a celor două fețe ale membranei interne, astfel că :

$$\frac{F \Delta E}{2{,}3\, RT} = \log. \frac{[H^+]_{ext.}}{[H^+]_{int.}}$$

Această relație exprimă legătura indirectă dintre potențialul transmembranar ΔE și gradientul de protoni la nivelul membranei, cu condiția să existe un schimb-difuzie între H^+ și Ca^+, Mg^{++} etc.

Mitchell consideră că această translocație a protonilor poate produce trei feluri de efecte : *a*) o diferență de *p*H între matrice și mediul exterior membranei interne mitocondriale ; *b*) un potențial transmembranar la nivelul membranei interne ; *c*) o combinație de diferență de *p*H și de potențial de membrană. Cea de a treia alternativă se exprimă astfel :

$$\log. \frac{[H^+]_{ext.}}{[H^+]_{int.}} = (p\text{H int.} - p\text{H ext.}) + \frac{F \Delta E}{2{,}3\ RT} = \Delta\, p\text{H} + \frac{F \Delta E}{2{,}3\ RT},$$

iar raportînd la formulele celelalte vom avea :

$$\log. \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}] \cdot [\text{P}]} = 2\left(\Delta\, p\text{H} \times \frac{F \Delta E}{2{,}3\ RT}\right) - \log. K\,[H_2O].$$

La 300 °C $K\frac{F}{2{,}3\ RT}$ este egal cu $\frac{1}{60}$ mV și $\log. K = 5$.

Înlocuind aceste valori în ecuația precedentă obținem :

$$\log. \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}] \cdot [\text{P}]} = 2\,\Delta\, p\text{H} + \frac{\Delta E}{30} - 5.$$

La o concentrație de fosfat de 0,01 M avem :

$$\log. \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]} = 2\,\Delta\, p\text{H} + \frac{\Delta E}{30} - 7.$$

Cu această ecuație se pot calcula ușor *p*H și ΔE necesari sintezei ATP pe seama ADP și P, cu un echilibru $\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]} = 1$ la sfîrșitul sintezei.

Astfel, $\log. \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]} = 0$ și $2\,\Delta\, p\text{H} + \frac{\Delta E}{30} = 7$, sau: $60\,\Delta p\text{H} + \Delta E = 210$ mV.

Cum s-a spus mai înainte, condițiile necesare sintezei ATP sînt fie o diferență de *p*H de 3,5 unități (acid la exterior), fie un potențial de 210 mV al membranei interne mitocondriale, fie amîndouă combinate (la un potențial de 150 mV și o diferență de $p\text{H} = 1$).

Mitchell își concepe teoria pe fundamentul unei *orientări stricte* a unor transportori la nivelul suprafețelor membranei mitocondriale interne. Așa, de pildă, în cadrul celei de a treia bucle de oxido-reducere, cytocromul-*c* este mai aproape de suprafața externă a membranei mitocondriale iar cel a_3 mai aproape de cea internă, cum este și de fapt.

Protonizarea rapidă a unui preparat de cloroplaste ($p\text{H} = 4$), urmată de repunerea în medii alcaline ($p\text{H} = 8{,}5$) cu ADP și fosfat, induce sinteza ATP. Dacă acest gradient de *p*H creat artificial induce sinteza ATP în cloroplaste, aceasta nu se realizează și într-un preparat de mitocondrii care, în aerobioză, sintetizează ATP chiar cînd raportul $\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]}$ este de 10.

Teoria conformațională a oxidării fosforilante. Fundamentată de C. Hackenbrock și D. Green, teoria caută să explice sinteza ATP în funcție de conformația proteinelor membranare mitocondriale. Se izolează mitocondrii din hepatocite în soluții izotonice de zaharoză

Scanned with OKEN Scanner

prin centrifugare diferențială, se suspendă totul în zaharoză izotonică, se fixează și se includ, studiindu-se astfel pe secțiuni ultrafine la microscopul electronic. Asemenea mitocondrii prezintă un aspect condensat ; au spațiul intermembranar dilatat, cu criste nedefinite și o matrice contractată și opacă. Dacă unui astfel de preparat mitocondrial i se adaugă un substrat oxidabil fără ADP, mitocondriile devin normale, în sensul micșorării spațiului intermembranar, al măririi și clarificării matricei și subțierii cristelor. Și mai departe, dacă se adaugă ADP, mitocondriile din nou se contractă, micșorîndu-se volumul matricei și mărindu-se spațiul intermembranar.

Energia chimică eliberată în cadrul respirației este transformată, după această teorie, în energie mecanică ce va servi la modificarea arhitectonicii macromoleculare a membranei mitocondriale. Se bănuiește existența unor constituenți membranari care induc într-un punct al membranei o schimbare în conformația arhitectonicii macromoleculare. Această modificare conformațională tranzitorie a constituenților moleculari membranari se propagă în restul membranei printr-un proces de „cooperare". Folosirea acidului naftolenilsulfonic (ANS) mai fluorescent în mediu lipofil decît în cel hidrofil, relevă tocmai schimbările de conformație membranară. Dacă după tratarea mitocondriilor cu ANS se adaugă ATP se produce creșterea fluorescenței, în timp ce agenții decuplanți o scad. După schema din figura 75 sinteza ATP este cuplată cu un transfer de electroni în lanțul respirator mitocondrial, fiind o cale, pe lîngă altele, prin care se conservă energia în mitocondrii.

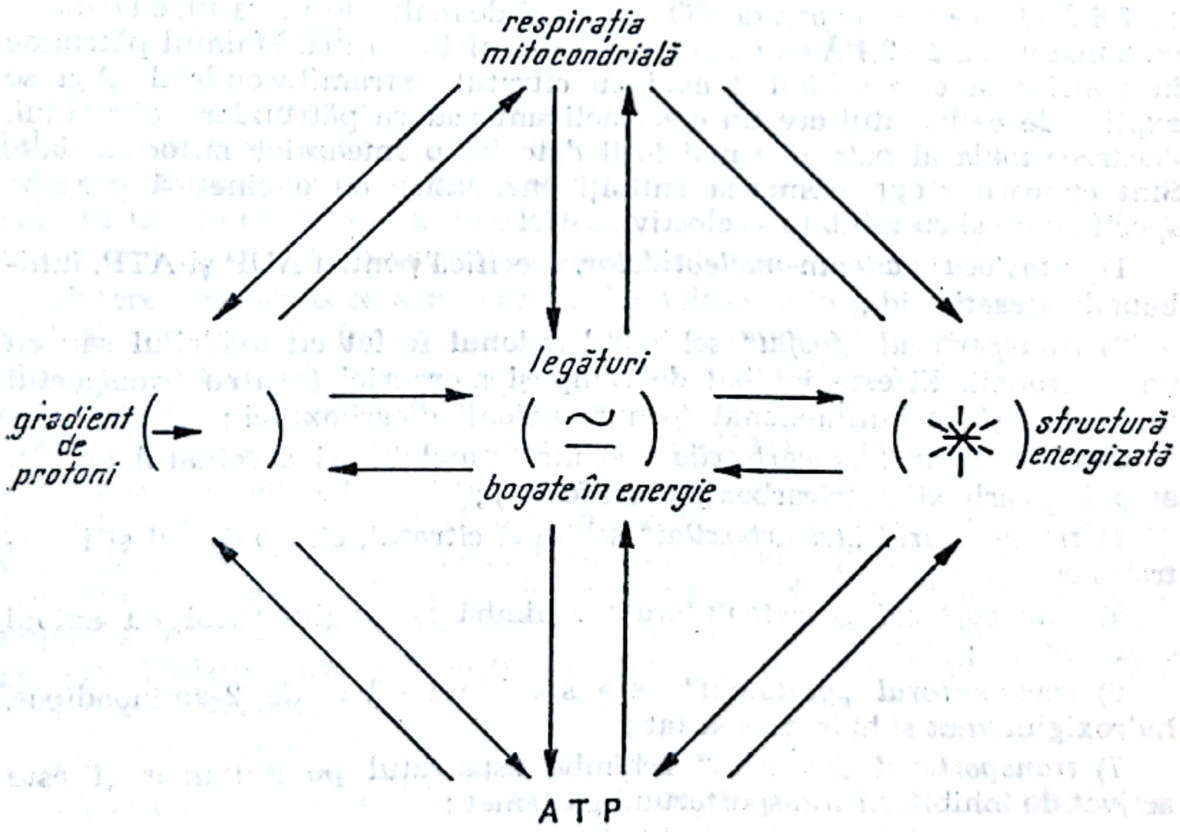


Fig. 75. Interconversiunea diferitelor forme de energie apărute în cursul fosforilării oxidative.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.5. PERMEABILITATEA MITOCONDRIILOR

Aceasta este diferită atît în ceea ce privește cele două membrane, cît și diferiții ioni și molecule mai mari sau mai mici. În privința membranei externe lucrurile sînt oarecum mai simple deoarece pătrunderea prin ea a moleculelor ionizate este rapidă, independentă de temperatură și reversibilă. În schimb, prin membrana internă asemenea molecule ionizate sînt transportate prin raport de energie, pătrunderea lor nedepinzînd de porozitatea membranei.

Anionii care intră în matrice sînt reprezentați fie prin substraturile ce vor fi oxidate în ciclurile Lynen și Krebs, fie prin substanțele de fosforilare (ortofosfat și adeninnucleotizi). Adeninnucleotizii pătrund prin schimb-difuzie, cu alte cuvinte intră atîția cît și ies, așa încît concentrația de adeninnucleotizi rămîne constantă. S-a măsurat, de pildă, că în etapa a 3-a a respirației intră 5 μM ADP și ies 5 μM ATP. Translocarea ADP este în același timp un factor limitant care controlează fosforilarea ADP extramitocondrial. Într-adevăr, matricea mitocondrială conține 10—15 mμM/mg proteină, AMP, ADP și ATP.

În condiții de aerobioză ADP-ul mitocondrial intrinsec este fosforilat primul și mai repede decît ADP-ul adăugat la mitocondrii. Viteza de fosforilare a ADP extramitocondrial este deci limitată la viteza sa de translocare. Metaboliții ciclului Krebs necesită, ca să poată trece prin membrana internă mitocondrială, PO_4^{---} dar și transportori. Succinatul și malatul au nevoie numai de fosfat, în schimb citratul, cu o moleculă mare, de 7,8 Å Ø, are nevoie atît de PO_4^{---} cît și de malat. Fumaratul, cu o moleculă mai mică, de 2,4 Å Ø, nu pătrunde sub nici o formă. Malatul pătrunde în matrice și este schimbat apoi cu citratul extramitocondrial. Așa se explică de ce malatul are un efect activant asupra pătrunderii citratului, deoarece malatul pătrunde mai întîi datorită permeazelor mitocondriale. Sînt cunoscute opt asemenea entități enzimatice cu o cinetică proprie, specificitate și cu inhibitori selectivi, astfel :

1) *translocaza adenin-nucleotidelor,* specifică pentru ADP și ATP, inhibată de atractilozid ;

2) *transportorul „fosfat"* schimbul anionul fosfat cu oxidrilul sau cu un dicarboxil. El este inhibat de compuși mercurici (pentru transportul fosfatului) și de butilmalonat (pentru anionii dicarboxilici ;

3) *transportorul „dicarboxilat"* schimbă malatul și succinatul cu alți anioni (dicarboxilat, tricarboxilat sau fosfat) ;

4) *transportorul „tricarboxilat"* schimbă citratul, cisaconitatul și izocitratul cu malat ;

5) *transportorul „α-cetoglutarat"* schimbă α-cetoglutaratul cu anioni dicarboxilici ;

6) *transportorul „glutamat"* este specific inhibat de 2-aminoadipat, hidroxiglutamat și hidroxiaspartat ;

7) *transportorul „aspartat"* schimbă aspartatul pe glutamat și este activat de inhibitorii transportorului glutamat ;

8) *transportorul „piruvat"* schimbă piruvatul intramitocondrial exclusiv cu piruvat extramitocondrial.

Scanned with OKEN Scanner

Acizii graşi sînt transformaţi în acilcarnitină pe care acilcarnitin-transferaza o introduce în mitocondrie.

În felul acesta mitocondria „selecţionează" anioni în măsura în care ei sînt folositori fosforilării oxidante, tocmai pentru a se aproviziona cu ei şi a se realiza fosforilarea.

Cationii, în special cei bivalenţi (Ca^{++}, Mn^{++}), pătrund mai uşor ca cei monovalenţi (K^+, Na^+), dar cu condiţia să fie însoţiţi de un anion „penetrant".

De pildă, Ca^{++}, împreună cu PO_4^{---}, pătrunde mai uşor în mitocondrie decît $NaCl^{--}$ care este nepenetrant. Într-adevăr, Ca^{++}, asociat cu Cl^-, intră în cantitate mică în matrice în schimbul protonilor din matrice care ies în afara mitocondriei. Intrarea calciului este consecutivă oxidării transportorilor mitocondriali, în final procesul oprindu-se. Prin adausul ulterior al fosfatului se anulează inhibiţia şi calciul intră din nou în matrice, respiraţia este stimulată iar transportorii se reduc parţial.

Intrarea calciului este de 10—100 ori mai rapidă decît a anionului fosfat, iar acumularea lui este un proces endergonic. Energia redobîndită sub formă de intermediari $A \sim I$ sau la un gradient de *p*H este folosită în diferite travalii printre care şi acela de acumulare a cationilor, prin intermediul transportorilor. Mimînd rolul de transportor, valinomicina, solubilă în lipide, complexează cu cationii monovalenţi (K^+), complexul este transportat prin membrana mitocondrială internă, iar potasiul este descărcat în matrice. În locul lui iese tot atîta hidrogen.

3.3.6. PUTEREA REDUCĂTOARE A MITOCONDRIILOR

Reprezintă o altă funcţie a acestora în activitatea metabolismului celular. Dacă sinteza de ATP mitocondrial reprezintă calea principală a conservării chimice a energiei rezultată din respiraţie, reducerile unor substraturi de către refluxul de electroni ai lanţului respirator reprezintă o cale endergonică de conservare a acestei energii.

Puterea reducătoare a mitocondriilor foloseşte în glicogeneza citoplasmatică care constă în sinteza glucozei pe seama piruvatului. Una din etapele acestei sinteze este transformarea difosfogliceratului în fosfogliceraldehidă catalizată de fosfogliceraldehid-dehidrogeneza în prezenţa NAD redus. Este, deci, necesară o reducere a NAD^+ extramitocondrial care se face prin cedarea H^+ de către malatul ieşit din mitocondrii. Obţinerea NADH nu este altfel posibilă, deoarece NADH mitocondrial nu poate ieşi datorită impermeabilităţii membranei. Pe de altă parte, în mitocondrii NADH care ia naştere în urma dehidrogenărilor din ciclul Krebs serveşte la reducerea oxaloacetatului în malat în prezenţa malat-dehidrogenazei. Malatul mitocondrial iese în afară, în citoplasmă, unde o malat-dehidrogenază catalizează reacţia inversă :

$$\text{Malat} + NAD^+ \rightleftharpoons NADH + H^+ + \text{oxaloacetat.}$$

NADH obţinut este folosit în glicogeneză. În acest fel, „echivalenţii reducţiei" sînt vehiculaţi de către malat din mitocondrii în citoplasmă, asigurîndu-se sinteza glicogenului (fig. 76).

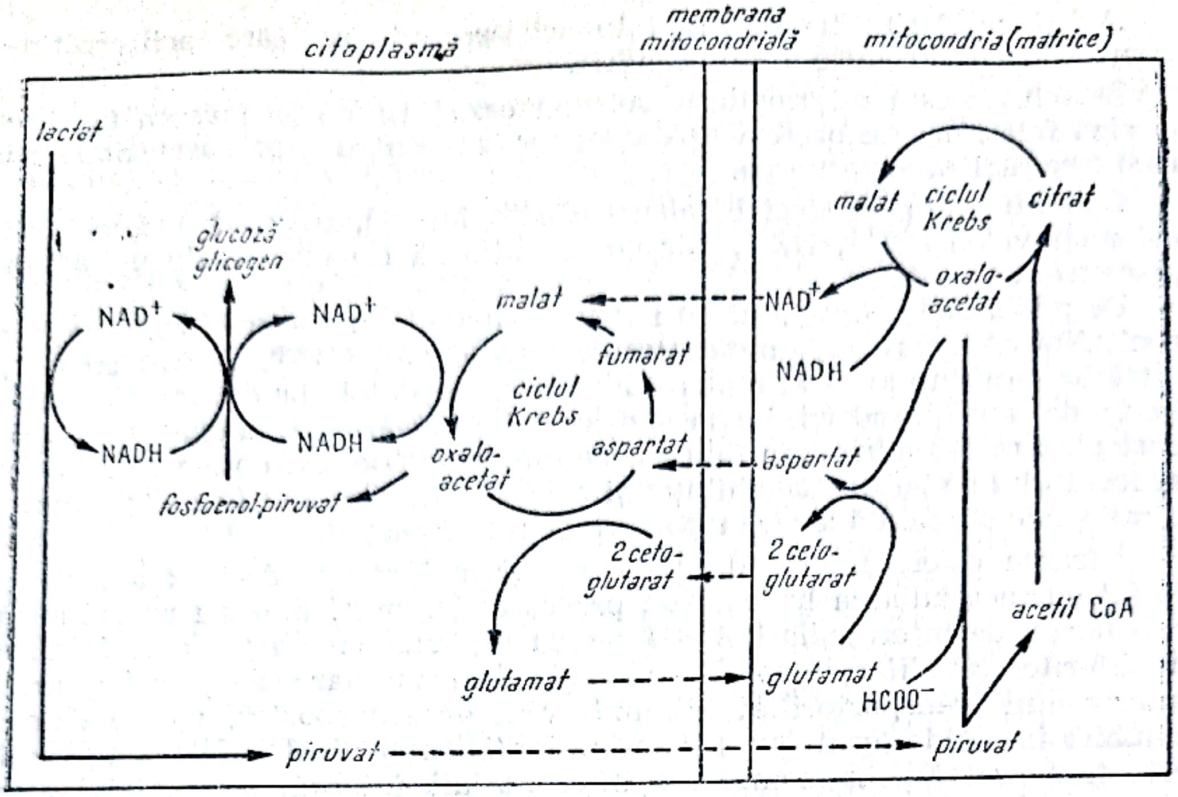


Fig. 76. **Puterea reducătoare a mitocondriilor.**

Etapa finală a catabolismului materialului de combustie are loc în mitocondrii, în timp ce majoritatea sintezelor anabolismului se desfăşoară în citoplasmă. Cuplarea catabolismului cu anabolismul se face prin transferul de echivalenţi reducători ce vin din mitocondrii. Membranele mitocondriale sînt impermeabile la oxaloacetat şi NADH, aceştia doi formează în cadrul ciclului Krebs mitocondrial, în prezenţa NADH, malat care, trecînd prin membrana mitocondrială în afară, regenerează în cadrul unui ciclu Krebs citoplasmatic NADH şi oxaloacetat. De asemenea, prin două transaminări succesive, şi anume una în mitocondrii, alta în citoplasmă, se formează aspartat care va intra în citoplasmă eliberînd acid oxaloacetic într-un ciclu Krebs.

3.3.7. SINTEZELE MITOCONDRIALE

Au fost demonstrate prin metode autohistoradiografice. Ele asigură însă un procentaj destul de mic de substanţe produse faţă de nevoile acestora. Aşa, de pildă, enzima δ-aminolevulinat-sintetaza, care catalizează sinteza δ-aminolevulinatului din succinil-CoA şi glicină — reglînd rata sintezei porfirinelor — este prezentă în fracţia mitocondrială a hepatocitelor şi eritrocitelor. Şi cum succinil-CoA este prezentă numai în membrana internă a mitocondriilor, iar aceasta este impermeabilă pentru esterii-CoA, probabil că δ-aminolevulinat-sintetaza este prezentă în toate tipurile de mitocondrii, fiind legată de necesitatea porfirinică a acestora. Dacă conversia δ-aminolevulinatului în coproporfirinogen are loc în citoplasmă, în schimb conversia coproporfirinogenului în hem are loc în mitocondrii.

În mitocondriile izolate ale diferitelor ţesuturi poate avea loc şi sinteza acizilor graşi. Aceasta se efectuează pe calea inversă, a oxidării acizilor graşi în prezenţa unui procent mare de $NADH^+/NAD^+$.

Scanned with OKEN Scanner

Carbamoilfosfat-sintetaza și ornitin-carbamoiltransferaza sînt enzime exclusiv mitocondriale și sintetizează citrulina din ornitină, CO_2 și NH_3, atestînd rolul mitocondriilor în biosinteza aminoacizilor.

3.4. BIOGENEZA MITOCONDRIILOR

Acest proces privește trei aspecte : *a*) formarea lor din alte structuri celulare ; *b*) creșterea și diviziunea din mitocondrii preexistente ; *c*) sinteza „de novo" a unor precursori submicroscopici și asamblarea lor într-o nouă populație de mitocondrii.

O serie de studii de microscopie electronică au arătat că formarea mitocondriilor s-ar datora unei înmuguriri sau evaginații cu strangulare a plasmalemei, reticulului endoplasmic, membranei nucleare și chiar a cisternelor golgiene. O lucrare de bază este a lui D. Luck (1963), care a tratat cu colină radioactivă o mutantă ce necesită colină, de la *Neurospora crassa* (fig. 77), prin care s-a dovedit diviziunea mitocondriilor.

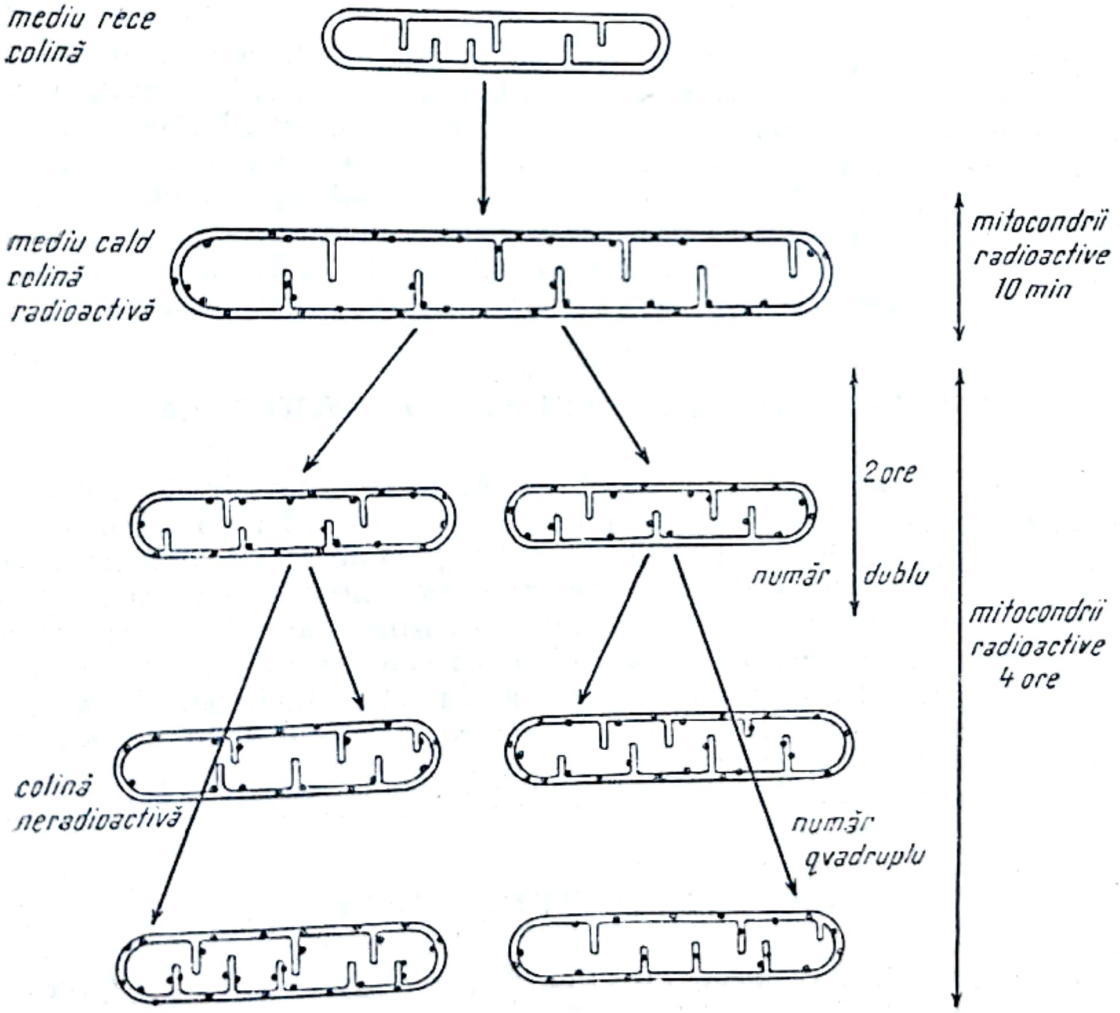


Fig. 77. Originea mitocondriilor la *Neurospora* (după D. Luck).

După 10 minute de tratament ciuperca este pusă în colină rece (neradioactivă) și autoradiografiată din timp în timp. În două ore, numărul mitocondriilor radioactive este dublu iar după patru ore este quadruplu, ceea ce înseamnă că mitocondriile s-au divizat în acest răstimp de două ori. În timpul acestei diviziuni ele se mai încarcă și cu ADN nuclear. Mitocondriile hepatocitelor de șoarece cu un deficit de riboflavine de 8 săptămîni, urmat de o hrănire normală timp de 3 zile, arată clar cum membrana internă împarte complet în două o mitocondrie. Pe de altă parte, drojdiile anaerobe facultativ, crescute în anaerobioză, conțin *promitocondrii* lipsite de enzimele transportoare de electroni și de membrană internă. La adaosul de oxigen apar mitocondrii tipice și respirația aerobă începe după patru ore, ceea ce sugerează asamblarea mitocondriilor din material precursor. La asemenea formări de mitocondrii noi este necesar cytocromul-c și fierul.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

RETICULUL ENDOPLASMATIC

Acest sistem de membrane intracitoplasmice, descoperit de K. Porter (1953), apare constituit din *tubuli, vezicule* mai mari, ovale pline cu un lichid fluid şi *cisterne* dilatate prin acumularea unui conţinut abundent, aşa cum a arătat G. Palade şi K. Porter. Cu alte cuvinte, citoplasma conţine un sistem tridimensional anastomozat de tubuli de 500—600 Å Ø, care prezintă pe traiectul lor dilatări cu aspect vezicular sau de adevărate vacuole mari ; alteori, reticulul endoplasmatic apare ca vezicule izolate mici (fig. 78).

Cercetări recente au arătat că membrana reticulului endoplasmatic are o grosime între 50—60 Å, în timp ce a plasmalemei este mai mare, de 75—100Å. În timp ce plasmalema are o structură trilamelară asimetrică, membrana reticulului are o structură simetrică. Membrana reticulului conţine 3,6% colesterol, are o predominanţă de acizi graşi nesaturaţi, lecitină şi fosfatidil-etanolamină. Afinitatea sa pentru Mg^{++} şi Ca^{++} dă posibilitatea aderării ribozomilor pe suprafaţa sa externă, cînd formează reticulul endoplasmatic rugos sau *ergastoplasma lui Garnier*.

4.1. IZOLAREA RETICULULUI ENDOPLASMATIC

S-a realizat prin centrifugare diferenţială, obţinîndu-se un sediment de vezicule cu ribozomi pe suprafaţa lor numite *microzomi*. Analizele biochimice au arătat un conţinut de 30—50% lipide şi un conţinut variabil de proteine de structură sau enzimatice, de 70—50%. Printre enzimele identificate citäm pe acelea ale sistemului transportor de electroni (NAD, NADP, cytocrom-*c*-reductază, diaforază, cytocrom-*b*5 şi *p*-450), unele enzime ale metabolismului glicogenului (glucozo-6-fosfataza, care se evidenţiază şi histochimic) şi pe acelea ale metabolismului colesterolului (enzimele formării colesterolului din acetat). S-au mai găsit şi enzime ale dezintoxicării (metilaze) şi ale hidroxilării hormonilor steroizi.

4.2. ROLURI ŞI ACTIVITĂŢI FIZIOLOGICE

Funcţiile reticulului endoplasmatic au putut fi stabilite prin studii combinate de citoenzimologie electronmicroscopică şi prin analiza fracţiei microzomale. Principala funcţie fiziologică a acestui constituent este de a *segrega* şi *concentra* diferite substanţe venite de la exterior sau prin

Scanned with OKEN Scanner

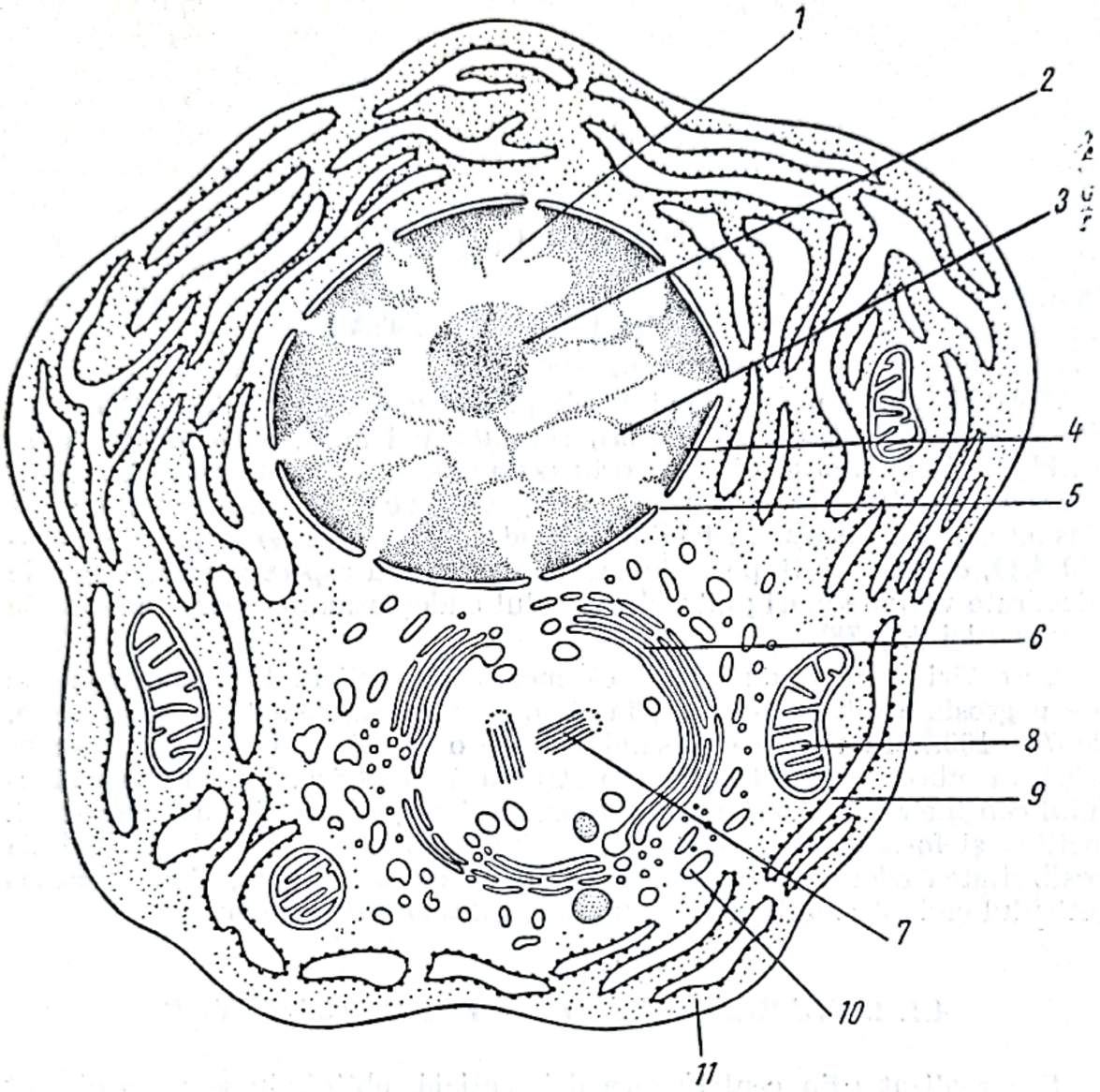


Fig. 78. Limfocit uman :
1 — carioplasmă ; *2* — nucleol ; *3* — cromatină ; *4* — membrană nucleară ; *5* — pori ; *6* — aparatul lui Golgi ; *7* — centriolii ; *8* — mitocondrie ; *9* — reticul endoplasmatic cu ribozomi ; *10* — vezicule golgiene ; *11* — hialoplasmă.

hialoplasmă. Astfel, în cursul ovogenezei de la greier, ovocita pinocitează proteinele endolimfei, iar veziculele pinocitare, care se desprind din plasmalemă, își varsă conținutul într-un reticul endoplasmatic agranular care este foarte dezvoltat în regiunea corticală a oocitei. Mai spre exteriorul celulei reticulul se umflă prin umplerea sa cu material proteic și din el se desprind apoi mici granule cu material proteic.

Aflatoxina poate induce în citoplasmă formarea unor *polizomi* giganți a căror structură în elice este caracteristică și care sînt prinși pe membrana reticulului. Structura în elice atît de mărită prin folosirea aflatoxinei este o caracteristică generală a polizomilor din celulele normale. Ei sînt atașați la membrana reticulului cu subunitatea mare, fără însă ca această atașare să influențeze activitatea de sinteză a complexului ribozo-

Scanned with OKEN Scanner

mal. Pentru H. Pilet, molecula de *m*-ARN se asociază cu o suprafață specifică din membrană formînd, împreună cu ribozomul și cu *t*-ARN, o unitate denumită de el *membron*, care are rol în reglarea sintezei proteice.

P. Siekevitz și G. Palade, încă din 1960, au postulat ideea că polizomii „liberi" sintetizează proteine pentru consumul interior, iar polizomii „legați" de membrană proteine ce vor fi eliberate. S-a reușit să se izoleze mai tîrziu două fracții de polizomi — legați și liberi — care au fost folosiți pentru sintetizarea proteinelor „in vitro".

Folosindu-se metodele imunoelectroforetice s-a demonstrat că polizomii legați de membrană formează proteinele serice, în timp ce polizomii liberi formează proteine diferite, care nu reacționează imunologic cu serul. Proteinele serice rămîn atașate de membranele asociate polizomilor, obținîndu-se încă odată dovada rolului *transportor* al acestor membrane, dar în afară de acest rol în primul rînd ar trebui luat în considerare acela *structural*, care repartizează în spațiu proteinele structurale. Plasmocitele, sintetizînd anticorpi, îi concentrează în cavitățile reticulului unde se acumulează uneori într-o cantitate atît de mare încît apar ca niște cristale cu structură periodică. Procesul de acumulare poate fi tranzitoriu, în cazul celulelor albumenului de la plante unde reticulul vacuolar se fragmentează dînd naștere la vacuole mai mici în care se acumulează proteine și fitoli. Astfel iau naștere *granulele de aleuronă*, cu un globoid format din fitoli și un cristaloid proteic. În cursul germinării granulele de aleuronă pierd fitolii și proteinele, redevenind vacuole cu lichid.

Rolul de transport al substanțelor este foarte bine demonstrat în cazul celulelor absorbante în care picăturile de lipide transportate prin pinocitoză traversează citoplasma prin cavitățile reticulului endoplasmatic, iar cînd reticulul comunică cu dubla membrană nucleară picăturile apar între cele două membrane. În cazul formării vitelusului din oocitele de rac, proteinele sintetizate în reticulul endoplasmatic granular din jurul nucleului sînt transportate prin reticulul agranular spre periferia celulei formînd vacuole periferice în care materialul proteic se condensează, capătă o structură cristalină, iar prin desprinderea vacuolelor de reticul se constituie vitelusul.

Distribuția substanțelor în celulă constituie fie o funcție permanentă, fie o funcție tranzitorie a reticulului endoplasmatic. În celulele musculare striate miofibrilele sînt înconjurate de un reticul endoplasmatic neted descoperit de H. Bennett și K. Porter. E. Anderson-Cedergren (1959) a arătat că în mușchi la pești, în dreptul striei *Z*, sarcoplasma trimite tubuli transversali *(sistemul T)* care, împreună cu reticulul endoplasmatic adiacent, formează așa-numita *triadă*. La mamifere, sistemul *T* se găsește în dreptul benzii *A*-1. După depolarizarea sarcoplasmei excitația este condusă prin sistemul *T* și adusă la triadă, eliberîndu-se calciu și ATP din reticulul sarcoplasmatic. Calciul difuzează spre punțile încrucișate actomiozinice și activează defosforilarea ATP-ului, care duce la contracția musculară. Mai precis, ca miofibrilele să se contracte, este necesară folosirea ATP, sau activitatea ATP-azică miofibrilară este declanșată de mici cantități de calciu. Astfel, o activitate ATP-azică ce atinge 5% din concentrația maximă necesită $1 \times 10^{-7} MCa^{2+}$, iar cînd mușchiul se contractă total concentrația Ca ieșit din reticulul endoplas-

matic ajunge la 2×10^{-6}M Ca. Eliberarea Ca din reticulul endoplasmatic se face la 1—2 ms de la excitație și începe să descrească de asemenea la 1—2 ms de la dispariția excitației.

Plasticitatea reticulului endoplasmatic în distribuția intracelulară a substanțelor reiese și din exemplul privind *rolul tranzitor* în endocitoza ciliatelor. La *Epistilis*, pe măsură ce vacuolele digestive se desprind din fundul citofaringelui ele sînt înconjurate de prelungiri ale reticulului endoplasmatic granular. Acesta încarcă cu hidrolaze acide vacuolele digestive. S-a demonstrat histochimic cum fosfatazele acide, încapsulate în vezicule, părăsesc reticulul endoplasmatic și se varsă în vacuola digestivă.

În sinteza steroizilor la vertebrate reticulul endoplasmatic joacă un rol esențial. Celulele interstițiale ale testiculului, celulele luteale și corticosuprarenale, au un reticul endoplasmatic agranular format din tubuli ce merg în toate direcțiile. În aceștia se acumulează colesterol care, apoi, este transformat în hormon. La hamster, unde corticosuprarenala nu folosește colesterolul pentru sinteza hormonilor, celulele corticosuprarenale nu au un reticul agranular dezvoltat.

În ceea ce privește originea reticulului endoplasmatic, E. Letuc (1968) demonstrează că este posibil să se obțină anticorpi cu membrane nucleare și reticul endoplasmatic de la celulele diferențiate. Studiind apoi în timp apariția anticorpilor, el constată că aceștia au o direcție centripetă începînd de la membrana nucleară și continuîndu-se spre exterior, pe măsură ce se dezvoltă reticulul endoplasmatic.

Un aspect interesant al sistemului de endomembrane îl reprezintă *lamelele inelate* evidențiate de H. Swift (1956). Ele se întîlnesc mai ales în celulele embrionare, atît în citoplasmă cît și în nucleu, ca și în celulele neoplazice. Au fost considerate ca o formă „născîndă" a reticulului endoplasmatic sau a membranei nucleare. Este vorba de o serie de duble membrane dispuse în pachete și prezentînd pori care, în ansamblul formațiunii, au o așezare hexagonală. Tot în celulele embrionare se găsesc cisterne perechi, mai multe asemenea formațiuni într-o singură celulă.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

RIBOZOMII

Sinteza proteinelor este legată de existența ribozomilor, denumiți astfel de R. Roberts, deoarece conțin acid ribonucleic. Ei au fost observați în 1953 de către G. Palade *(granulele lui Palade)* care i-a descris ca fiind niște granule cu dimensiuni în jur de 200 Å. De multe ori aderă la reticulul endoplasmatic, formînd *ergastoplasma* (reticulul endoplasmatic rugos) la celulele cu o proteosinteză activă. Dealtfel, I. Brachet, inspirat de lucrările lui V. Kedrowschi, a stabilit că așa-numita „ergastoplasmă" a lui Ch. Garnier reprezintă ARN-ul celulelor care sintetizează activ proteine.

5.1. STRUCTURĂ ȘI ULTRASTRUCTURĂ

G. Palade și P. Siekevitz (1956) au arătat că la nivelul ribozomilor are loc sinteza proteinelor (fig. 79). Ribozomii se întîlnesc la toate pro- și eucariotele. Sînt particule elipsoidale care se găsesc în număr

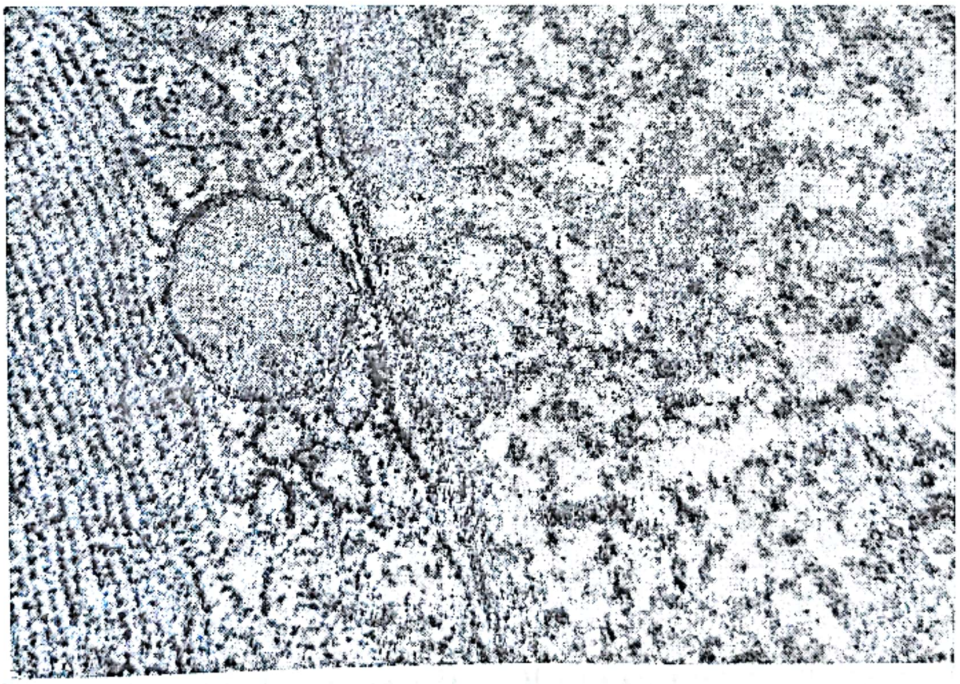


Fig. 79. Ribozomi (60 000 x) (după I. Trandaburu).

Scanned with OKEN Scanner

de 100/μ^3 în eritroblaşti. Celulele tinere, ca şi acelea care elaborează multe proteine, sînt bogate în ribozomi.

Extracţia ribozomilor se face prin ultracentrifugare diferenţială din ficatul de mamifere a unei fracţiuni din care s-au eliminat mitocondriile. Ea se face în soluţie de 1,3 mM zaharoză şi 10 mM Mg^{2+}. După centrifugarea de 150 min. la 10500 g, cînd se elimină plasmalema şi reticulul neted, în supernatant rămîne fracţia microzomală formată din vezicule ale reticulului endoplasmatic pe suprafaţa cărora se află ribozomi. Această fracţie se tratează cu dezoxicolat de sodiu care detaşează ribozomii de pe vezicule. O centrifugare la 20 000 g sedimentează veziculele, după care o ultimă centrifugare de 30 minute la 100 000 g sedimentează ribozomii liberi. Scăderea concentraţiei Cl_2Mg la 0,001 M disociază ribozomii în cele două subunităţi constitutive. La eucariote ribozomii au un coeficient de sedimentare de 80 S, care permite izolarea lor prin ultracentrifugare în mediu apos.

Un ribozom are în general lungimea de 300—340 Å şi grosimea de 200—240 Å, corespunzînd unui volum de 10×10^6 Å ^{3}.

Greutatea moleculară a ribozomilor este de 4×10^6, iar subunităţile sedimentează astfel : cea mai mică sedimentează la 40 S şi are o G.M. de 13×10^6, iar cea mare la 60 S, cu o GM de $2,6 \times 10^6$. Ribozomii conţin 45% ARN şi 55% proteine cu GM de 12 000—25 000 (tab. 7).

Tabelul 7

Viteza de sedimentare a ARN ribozomal de la diferitele feluri de ribozomi

Felul celulei de unde s-au extras ribozomii	ARN-ribozomal		Ribozomi
Hepatocit de şobolan	29,5	17,8	81 S
Fasole	25,9	17	78 S
Neurospora	25	17,4	77 S
E. coli	21,2	16	70 S
Mitocondrii	20,5	16,4	73 S
Cloroplaste	20,8	15,7	63 S

ARN ribozomal se împarte în trei clase de molecule : *1*) molecule de ARN din subunitatea mare de 60S care sedimentează la 28S. Acestea sînt formate din 5550 de nucleotide ; *2*) ARN care sedimentează la 18S, din subunitatea mică de 40S, format din 2500 nucleotide ; *3*) ARN care sedimentează la 5S, cu 120 nucleotide.

Ribozomii de la procariote sedimentează la 70S, au GM de $2,7 \times 10^6$, un conţinut de ARN de 65% şi sînt mai mici, avînd un diametru de 140—240 Å. Subunităţile lor sînt : *a*) 50S, cea mai mare şi conţine un ARN care sedimentează la 23S cu 3200 nucleotide, plus ARN-ul de 5S cu 120 nucleotide, greutatea moleculară a ARN-ului fiind de $1,2 \times 10^6$; *b*) subunitatea mică de 30S are un ARN constituit din 1 600 nucleotide, care sedimentează la 16S. Sînt 55 de proteine diferite repartizate astfel :

Scanned with OKEN Scanner

34 pe subunitatea mare și 21 pe cea mică. Atît ARN cît și proteinele sînt parțial accesibile la suprafața ribozomului. Subunitățile sînt structuri compacte și relativ impermeabile moleculelor de zaharoză.

Se admite, în general, că particula 30S pătrunde într-o cavitate existentă săpată în particula 50S. Pe de altă parte, o serie de cercetări recente întreprinse de E. Bennedetti, M. Nanninga și M. Lubin consideră că cele trei tipuri de ARN-uri ribozomale sînt filamente lungi pe care se găsesc înșirate cele 55 proteine sub formă globulară.

Proteinele ribozomale s-au putut separa prin electroforeză bidimensională, fiecare fiind caracterizată prin GM, compoziție chimică, valoarea *pK*, capacitatea de a se fixa direct și specific pe ARN și prin stoekiometria [1] sa în subunități. Din punct de vedere stoekiometric, proteinele sînt unitare (*U*), marginale (*M*) și fracționare (*F*). Proteinele din subunitatea mică au fost notate cu *S* și din cea mare cu *L*. Greutatea lor moleculară, în afară de S_1, este cuprinsă între 9 000—28 000, majoritatea dintre ele fiind bogate în arginină, lizină, avînd deci caracter bazic (tab. 8).

Tabelul 8

Proprietățile generale ale ribozomilor (după J. de Man)

Tipurile de ribozomi după valoarea *S* la care sedimentează	70 S		80 S	
Greutatea moleculară (G.M.)	$2{,}7\times10^6$		4×10^6	
Conținut în ARN	65%		45%	
Conținut în proteine	35%		55%	
Proteine bazice (GM.)	25 000		12 000—25 000	
Diametru	140—270 Å		220—300 Å	
Conc. optimă în Mg^{2+} pentru încorporarea maximă de aminoacizi	10—15 mM		1,5 mM	
Înhibarea proteosintezei de către antibiotice	+		−	
Subunități	30 S	50 S	40 S	60 S
G.M.	$0{,}9\times10^6$	18×10^6	$1{,}3\times10^6$	$2{,}6\times10^6$
G.M. a ARN	$0{,}6\times10^6$	$1{,}2\times10^6$	$0{,}6\times10^6$	$1{,}7\times10^6$
Valoarea *S*	16	23	18	28

M. Varo (1973) a evidențiat electronmicroscopic caracterul bazic al proteinelor ribozomale oocitare din momentul formării lor (fig. 80). În cazul subunității 30S proteinele au fost divizate, așa cum s-a arătat mai sus, în *unitare, marginale* și *fracționare*. Această heterogenitate a subunității ribozomale se explică printr-un schimb de proteine fracționare care ușurează etapele proteosintezei. Astfel, proteina fracționară S_1 atașează

[1] *Valorile stoekiometrice* se stabilesc prin raporturile cantităților fiecărei proteine izolată prin cromatografie pe coloană față de cele calculate teoretic.

Scanned with OKEN Scanner

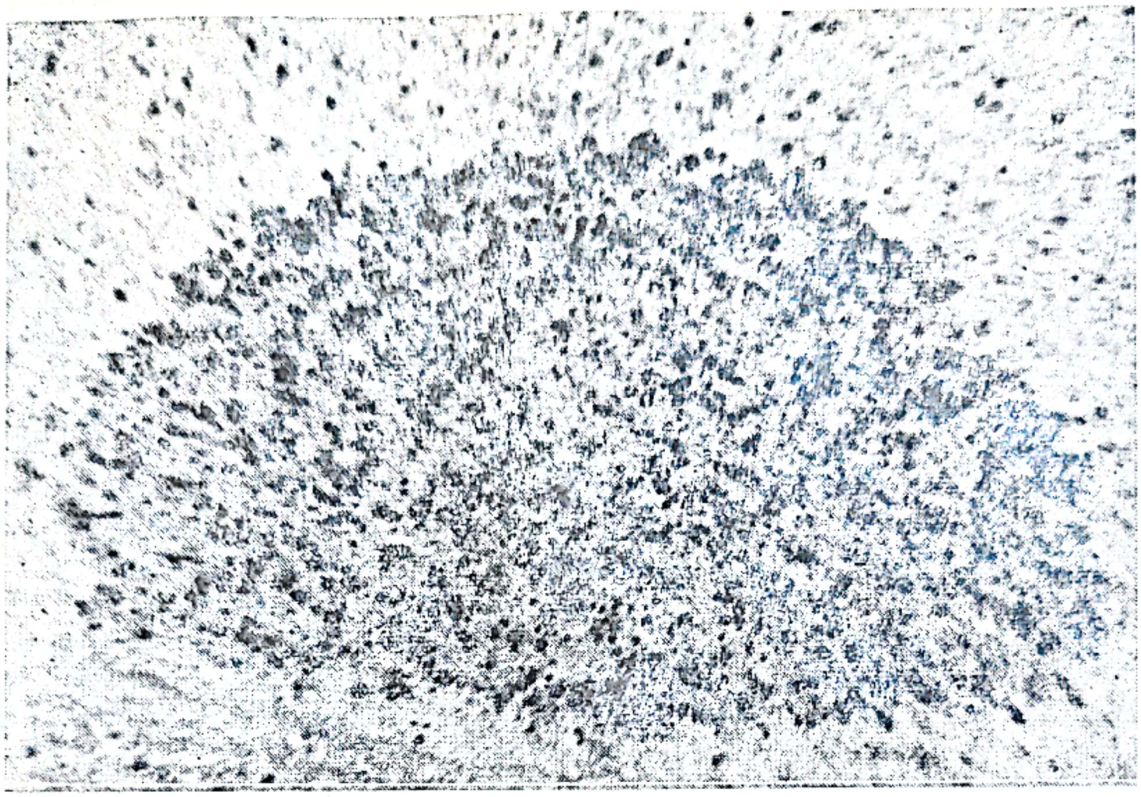


Fig. 80. Proteine bazice din ribozomi bogate în arginină.

m-ARN la subunitatea 30S. Proteina fracţionară S_{21} joacă rol în terminarea iniţierii proteosintezei, iar S_{21} şi S_6 concură cu factorul de iniţiere a proteosintezei.

R. Garrett şi H. Wittmann (1973) au măsurat lungimea ARN de 16S pe un film de carbon la microscopul electronic şi, după complexarea acestuia cu proteina S_4, au constatat că lungimea ARN se înjumătăţeşte, această proteină protejînd ARN de acţiunea nucleazelor.

Proteina S_4 joacă un rol important în asamblarea ribozomilor şi ea reacţionează în cazul ARN 16S cu mai mult de jumătate din lungimea lui, deoarece se înfăşoară în jurul proteinei. S-a mai putut demonstra că la ARN 5S locurile de legătură ale proteinelor L_{18} şi L_{25} se găsesc între nucleotidele 69 şi 110 ale acestuia. Experienţe la fel de interesante au fost realizate de N. Nomura (1970) prin amestecul proteinelor separate din subunitatea 30S cu ARN 16S izolat. Astfel găseşte că proteinele S_4, S_7, S_8, S_9, S_{16} şi S_{17} sînt necesare pentru formarea subunităţii în sensul asamblării ei. Aceste proteine de structură sînt şi ele la rîndul lor de mai multe feluri : S_4, S_7 şi S_8, ce se leagă direct de ARN 16S, fiind toate proteine *„unitare“* ; proteinele S_3, S_{10}, S_{12}, S_{14}, S_{19} sînt *„funcţionale“*, pentru că lipsa lor din subunitate împiedică proteosinteza. Celelalte proteine : S_2, S_{13}, S_{18}, S_{20}, S_{21} sînt numai parţial utile sintezelor proteice, iar S_6 de o necesitate relativă. S-a precizat că S_9 este prezentă la interfaţa dintre cele două subunităţi avînd rol nu numai în structuralizare, dar şi un rol important în sinteza proteică. Deci, conformaţia repliată a ARN-ului este influenţată de prezenţa acestor proteine, iar proteinele S_2, S_3, S_{14}, formează „situsul“ de fixare a aminoacil-*t*-ARN aşezat pe subunitatea 30S

Scanned with OKEN Scanner

5.2. MECANISMUL BIOSINTEZEI PROTEICE

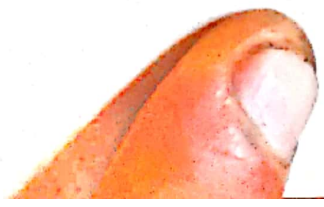
Acesta este realizat prin asocierea subunităților ribozomale cu *m*-ARN și *t*-ARN, care poartă aminoacizii. Ribozomul „se mișcă" de-a lungul *m*-ARN pînă cînd polipeptida este formată, astfel că la sfîrșit subunitățile ribozomale, ca și lanțul polipeptidic, se detașează de *m*-ARN.

Ribozomii există sub două forme : *a*) o *formă complexă — polizomi* — unde cele două subunități sînt legate la *m*-ARN (foarte mulți ribozomi pot fi legați de aceeași moleculă de *m*-ARN ; *b*) o *formă disociată*, inactivă pentru sinteze proteice, cînd cele două subunități sînt separate între ele și de *m*-ARN.

Procesul de sinteză a unui lanț polipeptidic se desfășoară în 3 etape : *a*) de *inițiere* ; *b*) de *alungire* ; *c*) de *terminare* a lanțului polipeptidic. La inițierea lanțului se formează un complex între subunitatea 30 S cu un triplet nucleotidic al *m*-ARN. Acest triplet este AUG sau GUG. Un *t*-ARN special (formilmetionil-*t*-ARN) descoperit la *E. coli* este obligatoriu pentru inițierea sintezei, ca și GTP [1]-ul și încă trei factori de natură proteică (*I.F.*$_1$, *I.F.*$_2$, *I.F.*$_3$). Factorii proteici *I:F.*$_1$, *I.F.*$_2$ sînt necesari fixării *t*-ARN prin faptul că interacționează cu subunitatea 30S și stabilizează complexul nou format. Factorul IF_3 are proprietatea să disocieze subunitățile ribozomale, iar pe de altă parte să reacționeze cu *m*-ARN și, prin structura sa proteică, „recunoaște" regiunile de inițiere de la mai mulți cistroni, care sînt unitățile funcționale ale lanțului de *m*-ARN ce dirijează structura proteică. Etapa de „alungire" începe în momentul cînd două molecule de *t*-ARN stau alături pe ribozom ; una dintre ele este denumită *peptidil-t-ARN* și are lanțul peptidic incomplet, iar cealaltă *aminoacil-t-ARN*. Prima ocupă pe ribozom „sita" peptidil notată cu *P*, a doua sita aminoacil sau *A*.

Pentru a se realiza aminoacil-*t*-ARN este necesară o anumită concentrație de aminoacizi dintre cei 20 mai des întîlniți, precum și un stoc minim de acilaze sau amionoacil-*t*-ARN-sintetaze. Aceste enzime nu au specificitate de grup sistematic decît la eu- și procariote. Ele „recunosc" aminoacidul respectiv și *t*-ARN corespunzător acestuia. În hialoplasmă au loc două reacții (fig. 81) : în prima se folosește energia dată de ATP și rezultă un aminoacil adenilat care, în a doua reacție, se leagă tot datorită acilazei de *t*-ARN formînd un aminoacil-*t*-ARN. Poziționarea met.-*t*-ARN$^{f.\ met.}$ la situsul *P* al ribozomului formează punctul de plecare al alungirii lanțului. Dacă la procariote sinteza începe cu formil-metionină, la eucariote inițierea se face numai prin metionină. În cadrul alungirii lanțului formarea legăturii peptidice are loc prin reacția nucleofilă dintre gruparea amino- de la aminoacil-*t*-ARN și esterul carboxilic al peptidil-*t*-ARN. Enzima care o catalizează este peptidil-transferaza, chiar din subunitatea 50S. Odată legătura peptidică realizată, peptidil-*t*-ARN care stă la sita *A* va fi dizlocat spre sita *P*, exact mai înainte ca aminoacil-*t*-ARN următor să se fixeze pe sita *A*. În același timp, *t*-ARN dezacilat este eliberat din situsul *P* iar *m*-ARN „va citi mai departe", mutîndu-se cu trei nucleotide față de ribozom. Lucrurile se petrec în așa fel încît tripletul

[1] *GTP* = guanozin-trifosfat.



Scanned with OKEN Scanner

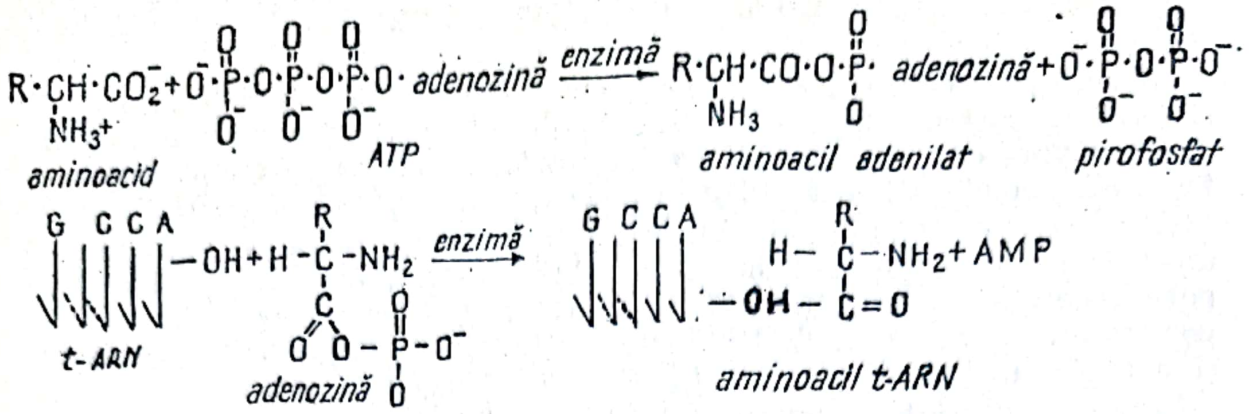
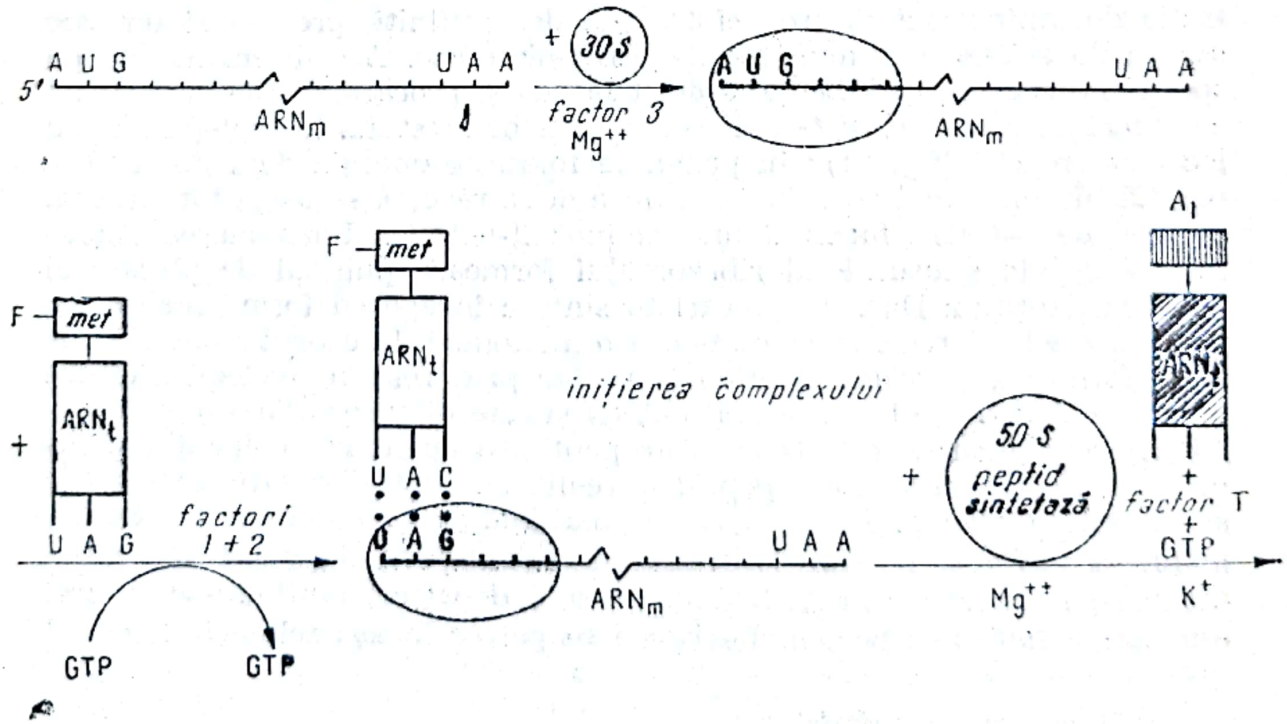


Fig. 81. Reacţiile sintezei aminoacil *t*-ARN.

nucleotidic — *codonul* — următor este aşezat exact în sita *A*. Factorii alungirii, denumiţi T_u şi T_s, înlesnesc fixarea aminoacil-*t*-ARN pe ribozom în prezenţa GTP.

Factorul G provoacă tot cu ajutorul GTP deplasarea peptidil-*t*-ARN şi a *m*-ARN. Sita de fixare a acestor factori pe subunitatea 50S este proteina L_7/L_{12} contractilă, bogată în alanină. Terminarea lanţului se face după „lectura" completă a segmentului de către *m*-ARN care defineşte structura primară a lanţului polipeptidic, cînd acest lanţ va fi scos după ribozom şi de la *t*-ARN ataşat. Eliberarea lanţului este produsă la un anumit semnal şi anume, de trei codoni de terminare UAA, UAG şi UGA, care nu definesc nici un aminoacid. Descifrarea semnalelor este dată de doi factori : R_1, care „recunoaşte" codonii UAA şi UAG şi R_2, pentru UAA şi UGA. Aceşti factori „recunosc" probabil tripletele şi sînt fie nişte esteraze, care hidrolizează chiar peptidil-ARN-t_1, fie compuşi care activează peptidil-transferaza, printr-un proces alosteric (fig. 82).



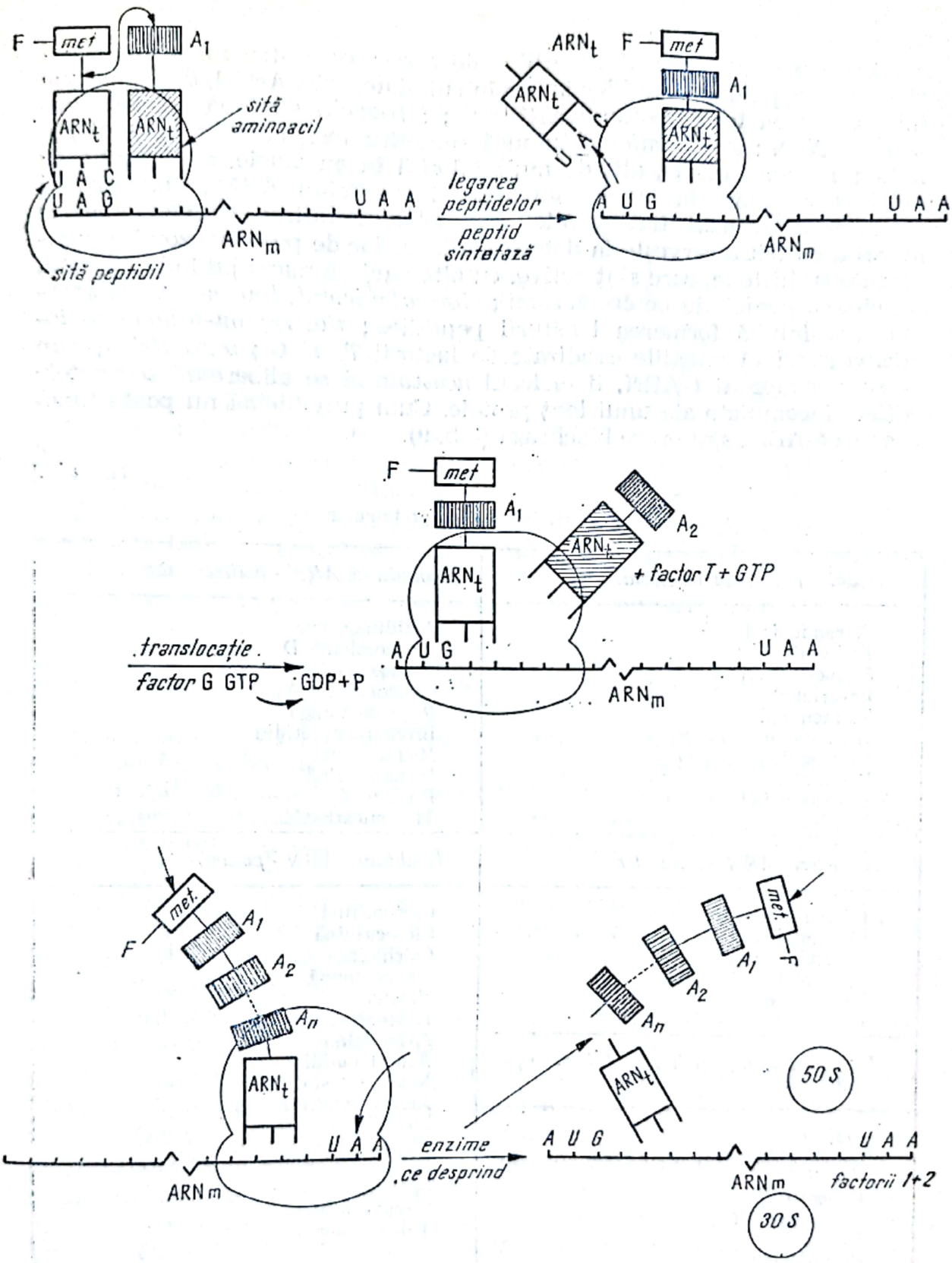


Fig. 82. Reprezentarea diagramatică după J. de Man privind mecanismul de biosinteză a proteinelor : AUG sau GUG = codoni inițiatori ; UAA, UGA sau UAG = codoni terminali.

Scanned with OKEN Scanner

*

Antibioticele au servit ca mijloc de cercetare a structurii şi funcţiei ribozomilor, pe lîngă rolul lor imens în chimioterapie. Astfel, *kasugamicina* inhibă fixarea formilmetionil-ARN$^{f.\,met.}$; *tetraciclina* inhibă fixarea aminoacil-*t*-ARN ; *streptomicina* tulbură corectitudinea citirii mesajului genetic ; *actinomicina D*, atît de mult folosită în oncologie, se combină cu ADN cromozomal la nivelul guaninei, împiedicînd ARN-polimeraza să acţioneze în sensul transcripţiei mesajelor. Folosirea actinomicinei D marcată cu tritiu serveşte la detectarea locurilor de pe cromozomi necomplexate cu histone, care sînt active, cu alte cuvinte marcajul indică tocmai activitatea genică de pe cromozomi ; *cloramfenicolul, lincomicina* şi *sparsomicina* inhibă formarea legăturii peptidice ; *tiostrepton-briamicin-siomicina* suprimă reacţiile catalizate de factorii T_u şi G ; *puromicina*, care este un analog al *t*-ARN, îi ia locul acestuia şi se eliberează secvenţele iniţiale incomplete ale unui lanţ proteic. Cum puromicina nu poate funcţiona ca *t*-ARN, sinteza se blochează (tab. 9).

Tabelul 9

Inhibitorii biosintezei proteinelor

Inhibitorii sintezei ribozomale	*Inhibitorii ARN - polimerazei*
Cloramfenicol Eritromicină 5-Fluorouracil Levorfanol Tetraciclină Gentamicină Kanamicină Neomicină Streptomicină	Acridin-orange Actinomicină D Aflatoxină B_1 Cromomicină A_3 Roşu de Congo Bromură de etidiu Mitramicină Nogalamicină Proflavină Tiosemicarbazidă
Inhibitorii ARN de transfer	*Inhibitorii ADN - polimerazei*
Edeină Lincomicină Mikamicină A Carcomicină Hidroxiuree Puromicină	Cazinofilină Clorochinină Colchicină Daunomicină Edeină Hidroxiuree Mitomicină Acidul nalidixic Neocarzinostatină Alcool fenetilic Fleomicină Pluramicină Primicină Sarcomicină Streptonigrină Tubercidină
Inhibitori ai alungirii lanţului polipeptidic	
Amicetină Cicloheximidă Fucidină Gugerotină Mikamicină B Nucleocidină Pectamicină Sparsomicină Streptovitacină A Acidul tenuazonic	

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

APARATUL LUI GOLGI

Aparatul lui Golgi face parte din *sistemul de endomembrane* celulare, fiind constituit în majoritatea cazurilor din teancuri de cisterne turtite, fără ribozomi. Funcţia sa principală este de segregare şi de maturizare a produselor biosintezei celulare, dar şi ca loc al diferenţierii citomembranelor şi de producere a veziculelor exocitare ale căror membrane sînt capabile să fuzioneze cu plasmalema.

J. Morre şi col. (1971) consideră ca fiind trei stadii în evoluţia aparatului Golgi : *1) cisterne ; 2) dictiozomi* şi *3) aparatul Golgi propriu-zis*. Acestea sînt de fapt trepte evolutive ale aceluiaşi aparat, întrucît se întîlnesc constant de-a lungul generaţiilor unui anumit tip de celulă.

6.1. STRUCTURĂ ŞI ULTRASTRUCTURĂ

Cisterna. Aceasta prezintă o parte centrală turtită numită *sacul* şi o parte periferică formată din *vezicule* ce se desprind din sacul, sau din *tubuli* ramificaţi. La *Aspergilus niger* se poate vedea cum o veziculă produce cisterne, iar la *Armillaria mellea* o singură cisternă reticulată şi neturtită, ca o reţea groasă, desprinde din ea vezicule „acoperite" şi vezicule „secretoare".

Dictiozomii. Sînt formaţiuni golgiene în care mai multe cisterne se turtesc şi formează ca un teanc ; numărul lor variază de la 5 la peste 30. Dictiozomul este polarizat, în sensul că cisternele de pe o faţă sînt diferite de acelea de pe faţa opusă.

Aparatul golgian simplu şi complex. Este reprezentat prin dictiozomi răspîndiţi în toată citoplasma (fig. 83).

D. H. Northcote (1971) integrează aparatul lui Golgi în complexul reticulului endoplasmic, al veziculelor şi lizozomilor. După C. De Duve (1969) acest organit este o verigă în cadrul sistemului de transport de la nucleu, reticul, dictiozomi, vezicule, lizozomi, tonoplast şi plasmalemă. În cadrul acestui sistem iau naştere proteinele, polizaharidele, glicoproteinele şi, probabil, unele lipide şi fosfolipoproteine membranare. Conexiunea cu nucleul procură sistemului acizii nucleici necesari sintezelor poliribozomale încă de la începutul diferenţierii. Reţinem faptul că încă acum 60 ani R. Y Cajal a emis ideea că aparatul reticular intern, cum i se spunea atunci, este de fapt o reţea canaliculară. Ori stu-

Scanned with OKEN Scanner

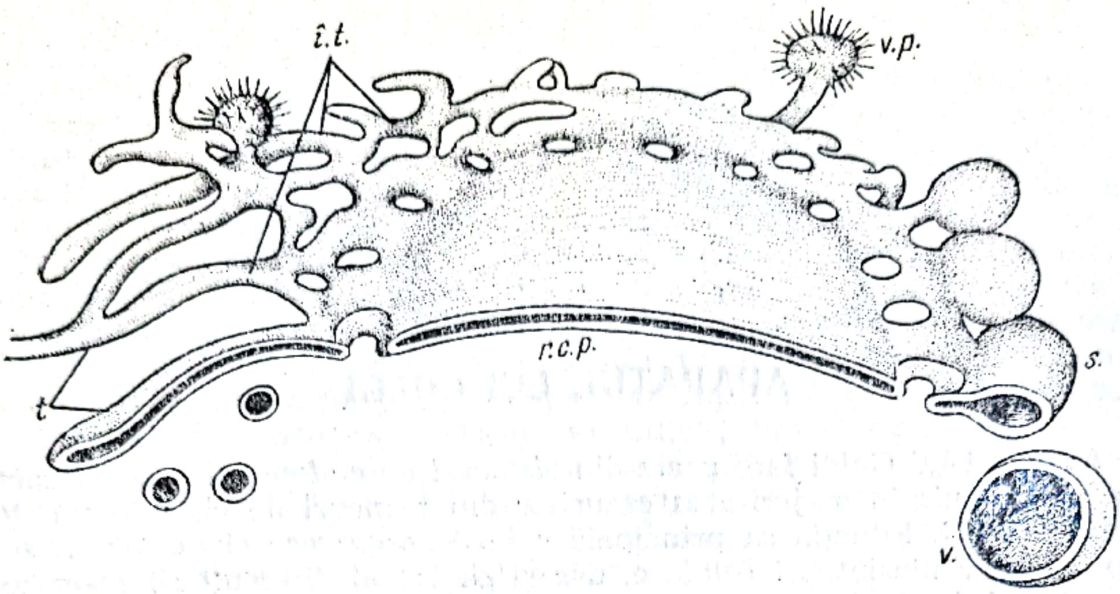


Fig. 83. Cisternă dictiozomică :
v — vacuolă ; *s* — sacul ; *v.p.* — vezicule păroase ; *t* — tubuli ; *î.t.* — împîslire de tubușoare la periferia saculului ; *r.cp.* — reticul citoplasmatic.

diile recente de microscopie electronică ale școlii lui A. Frey-Wyssling au arătat fenestrarea periferică a cisternelor și legarea dictiozomilor dintr-un complex prin canalicule lungi și anastomozate.

Aparatul lui Golgi se poate studia în unele cazuri „in vivo" (de exemplu, la spermatocitele de *Helix*) în contrast de fază, cînd apare foarte pleomorf. Se pot vedea foarte bine dictiozomii ca niște *discuri* concav-convexe, dar pot lua și forme de *granule* compacte mici, mase voluminoase mari și chiar o rețea de *filamente*. Această modificare a formei se datorește activității lor metabolice (fig. 84, 85 și 86).

Microscopia electronică a permis, începînd cu A. Dalton și M. Felix (1952), descrierea detaliată a acestor structuri. Metoda criogravurii, practicată recent pe piese proaspete de țesuturi animale și vegetale, subliniază încă odată structura dictiozomilor, alcătuiți din 3—12

Fig. 84. Dictiozomi (x 1 200) în spermatocitele de *Gryllotalpa* (după M. Varo).

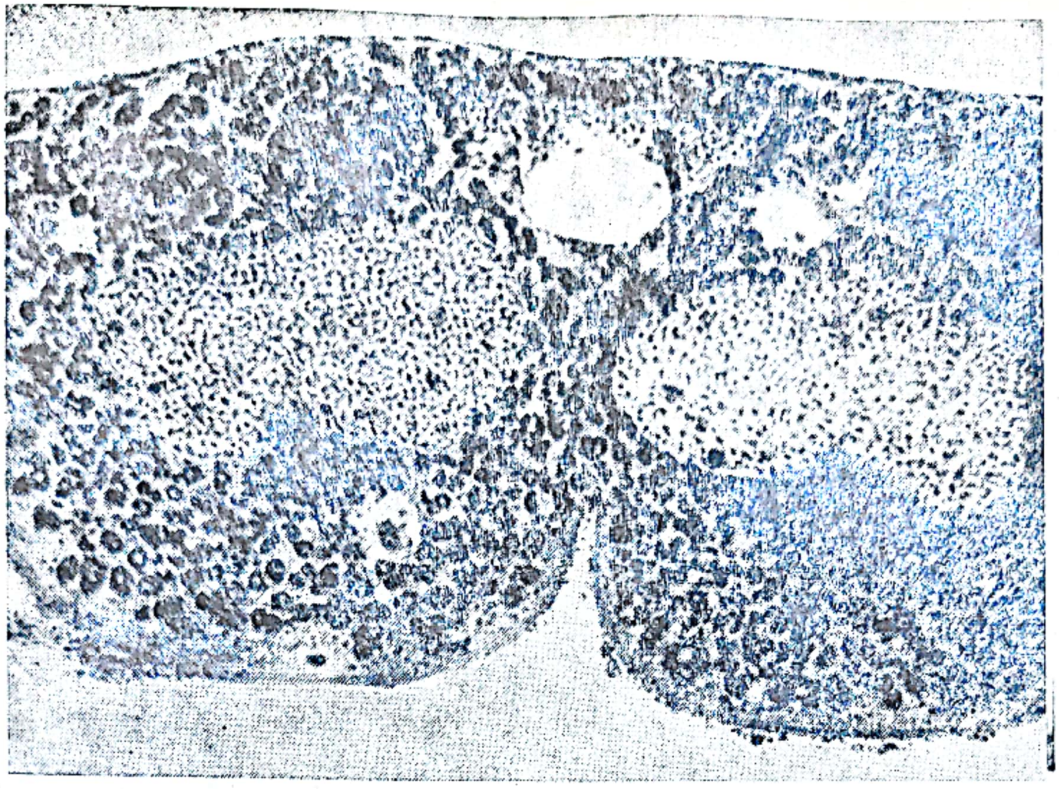


Fig. 85. Dictiozomi în celulele canalului deferent de la izopode (după I. Steopoe) (x 1 200).

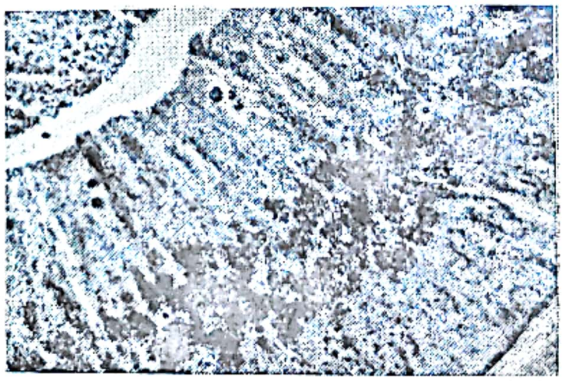


Fig. 86. Rețele de dictiozomi (x. 1 200) din glanda multifidă a melcului de grădină (după M. Varo).

cisterne turtite și suprapuse, cu o față concavă și una convexă, care se regăsesc în majoritatea celulelor. Între cisterne se află uneori un material mai dens iar fenestrarea lor crește de la fața convexă la cea concavă. Așa se face că sacului de pe fața concavă sînt străbătuți de pori mari care, de fapt, îi fragmentează într-o rețea de tubuli.

6.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ

Din punct de vedere citochimic, aparatul lui Golgi a fost studiat încă pe vremea cînd structura sa era în discuție. S-a detectat o cantitate de lipide după „digestia" cu enzime proteolitice, urmată de o colorație cu negru-Sudan B. Metoda hemateinei acide a lui I. Baker evidențiază fosfolipidele care sînt în cantitate egală cu proteinele, dacă ne referim la

Scanned with OKEN Scanner

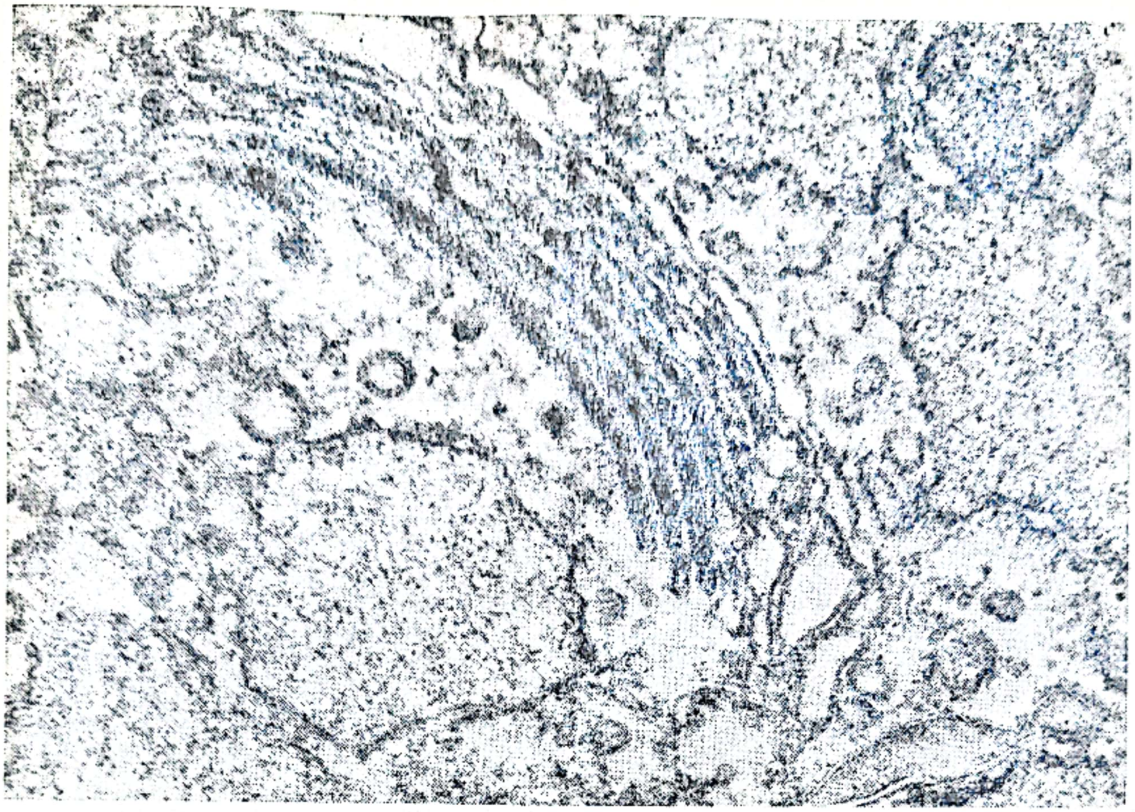


Fig. 87. Cisterne golgiene pline cu fosfatază acidă.

rezultatele analizelor chimice ale fracțiilor golgiene obținute prin centrifugare diferențială. Aparatul parabazal al flagelatelor conține glicogen, iar dictiozomii din canalul deferent al izopodelor mucopolizaharide. În multe tipuri de celule saculii golgieni au și vitamina C. În privința enzimelor citām : fosfatază alcalină, glucozo-6-fosfatază, fructozo-6-fosfatază și estron-3-fosfatază, fosfatază acidă (fig. 87), 5-nucleotidază. În cantități mari se pot găsi adesea, uneori chiar specific, tiamin-pirofosfatază, guanozin-, uridin- și inozin-difosfatază ; galactozil-transferaza este însă sigur caracteristică.

6.3. ROLURI ȘI ACTIVITĂȚI FIZIOLOGICE

Dacă în trecut aparatul lui Golgi era considerat de A. Nassonov ca o „glandă a celulei", în prezent este bine demonstrat rolul său în sistemul de transport intracelular. În afară de *transport și secreție*, aparatul golgian *furnizează material membranei celulare*. În plus de aceste trei funcții mari și în legătură cu ele, aparatul lui Golgi joacă diferite roluri într-o serie de țesuturi (fig. 88).

6.3.1. REGLAREA CONȚINUTULUI CELULAR ÎN APĂ

Există alge *(Glaucocystis, Vacuolaria)* care au vacuole contractile ce provin din veziculele golgiene. Cînd se golește vacuola, membrana sa se contopește cu plasmalema iar lichidul este eliminat prin eccitoză. După

Scanned with OKEN Scanner

aceea o altă veziculă golgiană se încarcă cu lichid, fuzionează cu plasmalema și-l elimină la exterior. Astfel, conținutul unei vezicule de 8 µm Ø se elimină în 75 s, iar în 30 minute cantitatea de apă eliminată este cît volumul celulei (26 µ Ø); într-o oră, cam de 6 ori suprafața membranei veziculare se adaugă la membrana celulară. În același timp se uzează și dispare cam tot atîta cantitate de membrană celulară, care este endocitată în citoplasmă unde se dizolvă în părțile sale componente care, probabil, folosesc refacerii cisternelor golgiene.

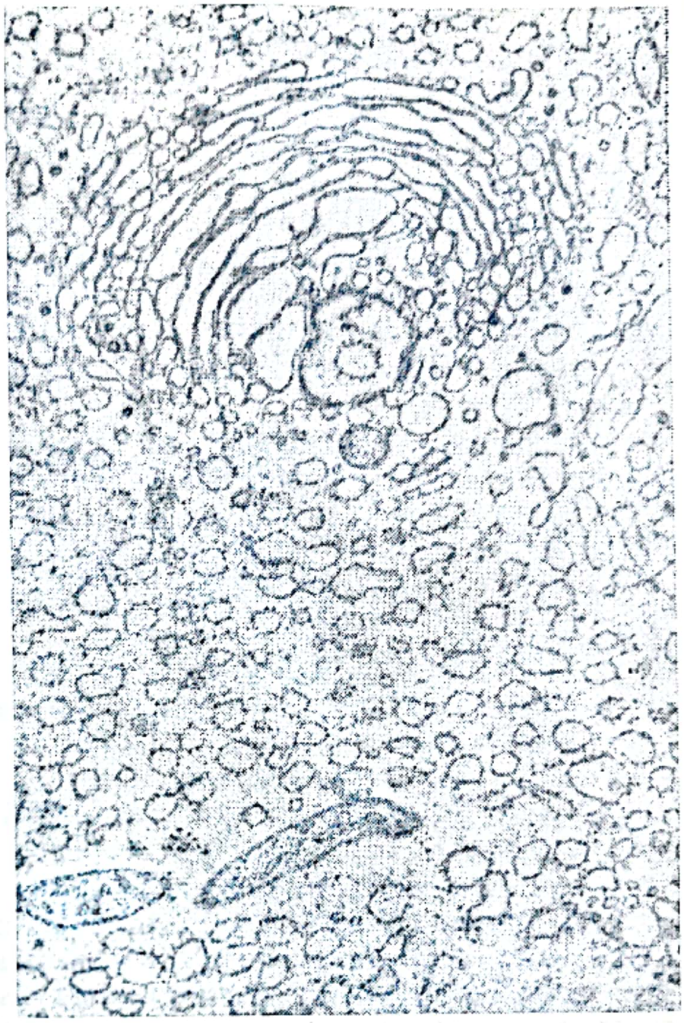


Fig. 88. Dictiozom, reticul endoplasmatic cu ribozomi și vezicule transportoare (x 10 000) (după M. V a r o).

6.3.2. ACUMULAREA DE HIDRAȚI DE CARBON

A fost demonstrată histochimic și autohistoradiografic. Celulele plantelor acumulează în cisternele golgiene oligomeri solubili ai glucozei, manozei, galactozei, xilozei și arabinozei. Această acumulare poate concentra mari cantități de acizi uronici, cum este cazul formării acrozomului spermatozoizilor. În spermatida tînără se găsesc mai mulți dictiozomi care se unesc prin marginile lor, formînd o calotă mare în interiorul căreia apare o veziculă proacrozomică. Vezicula rezultă din contopirea cîtorva vezicule golgiene desprinse din cisterne. În mijlocul ei se acumulează o substanță poliholozidică. Vezicula acrozomică conține *acrozomina*, o enzimă cu care spermatozoidul hidrolizează membranele ouălor. În felul acesta, membrana spermatozoidului se contopește în acel loc cu membrana oocitei și pronucleul mascul pătrunde în oocită. Poliholozidele acrozomale sînt inhibitori naturali ai acrozominei. Alți uronizi, proveniți din aparatul lui Golgi, reprezintă componente ale hemicelulozei, mucilagiilor și a altor învelișuri celulare. Așa, de exemplu, galacturonizii, avînd grupările carboxilice parțial metilate, reprezintă unitățile materialului pectic intercelular de la plante.

În pancreasul exocrin granulele de zimogen au o dublă origine : partea proteică are originea din ergastoplasmă, iar cea glucidică este combinată cu proteinele în cisternele golgiene. Iată cum se petrece acest fenomen

Scanned with OKEN Scanner

după G. Palade, care a stabilit dinamica și citologia lui : enzimele digestive (α-amilaza și α-chimotripsinogenul) sînt sintetizate la nivelul polizomilor, de unde trec în interiorul reticulului endoplasmatic pînă spre capetele sale netede din apropierea aparatului lui Golgi. Pe aici enzimele ies și sînt incluse în veziculele mici transportoare și sînt vehiculate prin citoplasmă spre suprafața de formare a aparatului. Proteinele sînt concentrate din ce în ce mai mult în cisternele de elaborare, de unde se desprind ca vezicule. Prin „maturarea" acestora are loc formarea granulelor clasice de prozimogen și mai apoi de zimogen. Conținutul vacuolelor de zimogen este eliminat din celulă prin pinocitoză inversă.

Ciclul secretor al pancreasului exocrin a fost împărțit în următoarele etape :

1) Încorporarea aminoacizilor în enzimele specifice. Ea are loc pe ribozomii atașați de membrana reticulului endoplasmatic rugos.

2) După terminarea sintezei enzimelor pancreatice, acestea sînt transferate și segregate în interiorul reticulului endoplasmatic rugos.

3) De aci enzimele sînt duse la partea formatoare a aparatului lui Golgi, prin veziculele transportoare.

4) Enzimele sînt incluse în cisternele golgiene și apoi desprinse din ele ca vezicule golgiene (proteinele sînt legate în acest timp de o componentă glucidică care constituie un inhibitor natural al enzimelor).

5) Granulele de zimogen de natură mucoproteică migrează apoi din aparatul lui Golgi la polul apical al celulei unde sînt eliminate prin pinocitoză inversă.

În celulele caliciforme intestinale, dictiozomii au o față convexă *(formatoare)* și una concavă *(de maturare)* de pe care se individualizează produsele de secreție sub formă de vezicule înconjurate cu o membrană. Mucopolizaharidele acide iau naștere în cisternele feței de maturare, care se fragmentează în veziculițe mici ce fuzionează după aceea în macrovezicule care dau, cu timpul, picăturile de mucus.

M. Neutra și C. Leblond au urmărit prin autohistoradiografii sinteza hidraților de carbon în celulele caliciforme duodenale de la mamifere injectate cu glucoză —^{3}H. Și în acest caz s-a constatat biosinteza proteică în polizomii reticulului endoplasmatic rugos, dar asocierea cu partea glucidică sau cu —SO_4^{--} se face în aparatul lui Golgi. Numai la 5 minute de la injecția cu glucoză —^{3}H aceasta apare în dictiozomi, după 20 minute în vacuolele care se desprind de pe fețele secretoare, și după alte 30 minute în toate vacuolele cu mucus din citoplasmă. Bineînțeles că în dictiozom are loc transformarea glucozei în monozaharide (hexamine, aldoze, acizi sialic și hexuronic), după care are loc combinarea, prin condensarea acestora, cu proteinele. În cazul injecțiilor cu galactoză —^{3}H se constată apariția marcajului după 10 minute în dictiozomii celulelor care secretă glicoproteine și mucopolizaharide acide și numai după 30 minute apar și vacuolele marcate. Sulfatarea glucidelor se face tot de către enzimele aparatului lui Golgi, deoarece la injecția cu sulfat de sodiu marcat cu ^{35}S acesta se localizează mai întîi în cisterne și apoi în granulele de mucus.

În celulele antehipofizare care sintetizează hormonii glicolipidici, foliculostimulant, tireo-stimulant și adrenocorticotrop, etapa terminală a sin-

Scanned with OKEN Scanner

tezei are loc în dictiozomi unde se conjugă gruparea glucidică la proteine. De pildă, celulele β (F.S.H.) din partea anterioară a hipofizei de la amfibieni se golesc de granule în martie, cînd are loc împerecherea și cînd testiculele se golesc de spermatozoizii stocați în timpul iernii. Degranularea este paralelă cu o extensie mare a dictiozomilor, prin creșterea veziculelor, consecutivă cu hipersecreția hormonală. Vara, celulele gonadotrope își micșorează numărul granulelor și în septembrie reîncepe apariția granulelor prin dezvoltarea ergastoplasmei și a cisternelor golgiene din care se desprind primele granule de secreție cu hormon gonadotrop.

6.3.3. SECREȚIA MATRICEI PEREȚILOR CELULARI

Membrana scheletică a celulelor vegetale este formată din polizaharide care apar ca hemiceluloze și compuși pectici în matrice și ca o rețea fibrilară de α-celuloză. Prima etapă a formării are loc în timpul diviziunii celulare cînd apare un septum în planul ecuatorial al fusului, numit *placă celulară*. Ea provine din contopirea unor vezicule precursoare provenite din vezicule golgiene submicroscopice de 100 Å (fig. 89). Printre aceste vezicule străbat numeroși tubuli ai reticulului endoplasmatic. Între cele două celule se formează un dublu perete de origine golgiană compus dintr-o lamelă mijlocie care separă doi pereți primari și cele două plasmaleme de natură golgiană. Materialul matricei, adică compușii pectici și hemicelulozele, provin din conținutul veziculelor golgiene iar plasmalemele din membrana lor. Mai tîrziu sinteza α-celulozei este catalizată de plasmalemă și fibrele formate impregnează matricea plastică conferindu-i elasticitate, rezistență mecanică și, prin orientarea lor, o anizotropie optică.

Fig. 89. Schema formării unui nou perete celular după mitoza celulei vegetale : veziculele golgiene (*v.G.*) care conțin un material dens se aliniază și apoi se contopesc în vezicule mari care, ulterior, conflluează formînd placa celulară (*pl.c.*). Ea se compune dintr-o lamelă mijlocie (*l.m.*), care separă doi pereți primari (*p.p.*), iar membrana golgiană dă plasmalema (după Frey-Wyssling).

Cînd se diferențiază o celulă meristematică membrana sa crește prin intususceptiune. În acest caz, veziculele golgiene cresc și încorporează material citoplasmatic prin invaginații. Ele conțin acid galacturonic și zaharuri foarte solubile în apa componentelor pereților celulari. Se nasc corpi multiveziculați acoperiți cu o membrană al cărei conținut este exocitat prin peretele celular iar membrana lor se încorporează la plasmalemă. Astfel se dublează suprafața celulelor epidermei rădăcinilor de *Triticum* în 8 ore, a epidermei coleoptilului de *Avena* în 30 de minute, iar a firelor de iarbă într-un minut. La un tub de polen care crescînd astfel ajunge la liliacee de 5 cm, creșterea suprafeței plasmalemei este de 1 000 ori.

6.3.4. METABOLISMUL SULFATULUI

Unele celule elaborează o serie de compuși sulfatați ca M.P.Z. [1] acide, proteine, lipide, fenoli, derivați ai tiroxinei, arilamine și steroizi. Injectarea de $H_3{}^{35}SO_4$ la șoarece, prin perfuzie intravenoasă (5—90 minute), a permis lui R. Young (1973) să urmărească încorporarea sa pe preparate autoradiografice, electronmicroscopic. În felul acesta, s-a observat că în toate cele 14 tipuri de celule care elaborează compuși sulfați, granulele de argint se localizează în saculii și vacuolele golgiene. De pildă, granulocitele, în special cele neutrofile, prezintă un complex golgian bine marcat, deoarece granulele azurofile formate de el au niște M.P.Z. acide sulfatate. Aceeași localizare a marcajului o regăsim la megacariocite care produc un condroitin-sulfat-*A*, izolat biochimic din nucleoidul plachetelor sanguine.

Celulele reticulate, inclusiv cele endoteliale, încorporează sulfatul în aparatul lui Golgi care elaborează matricea extracelulară, după cum fibroblaștii produc condroitin-sulfații-*B* și *C* ai colagenului în același constituent citoplasmatic, care se marchează distinct. Keratocitele concentrează în complexul golgian din vecinătatea nucleului sulfatul radioactiv cu care conjugă mucopolizaharidele, condroitina-*A*, keratina și glicoproteinele stromei corneii transparente. S-a mai descris o încorporare selectivă a ^{35}S în complexul golgian al ganglionilor simpatici, ai celulelor satelite și celulelor Schwann din sistemul nervos. Datele biochimiei și histochimiei sprijină părerea după care sulfatidele mielinei și mucopolizaharidele (condroitin-sulfații-*A* și *C* și heparina) sînt produse chiar în cisternele și veziculele golgiene. În sfîrșit, mucopolizaharidele lichidului folicular ovarian sînt elaborate tot de aparatul lui Golgi din celulele foliculare.

În timpul biosintezelor tuturor acestor molecule, sulfatul este mai întîi activat de ATP în doi timpi : mai întîi aril-sulfurilaza catalizează formarea adenozin-5′-fosfosulfatului (APS) din ATP și SO_4, după care APS-kinaza fosforilează APS cu ATP producînd 3′-fosfoadenozin-5′-fosfosulfat (PAPS) ; în etapa a doua, sulfatul activat este transferat de către sulfotransferaze pe o moleculă acceptoare. Toate aceste enzime caracterizează membranele golgiene ale celulelor care produc compuși sulfatați.

6.3.5. SECREȚIILE SOLIDE

S-a observat că solzii la algele verzi și brune, de exemplu, iau naștere din cisternele golgiene. Asemenea solzi se măresc progresiv și sînt eliminați de vezicule în afara celulei. La alga marină crisoficee *Pleurochrysis* se observă la început un centru de polimerizare dezvoltat intracisternal, în care apar microfibrile. Ele sînt mai întîi lipite de membrana internă a cisternei și mai tîrziu echidistante de cele două membrane, iar în final aparatul lui Golgi asamblează partea fibrilară — celulozică cu cea amorfă — pectică sub forma unui solz, care va fi eliminat prin eccitoză.

[1] *M.P.Z.* = mucopolizaharide.

Scanned with OKEN Scanner

6.3.6. TRANSLOCAREA

Este un alt rol evidenţiat de către D. Northcote, pentru care aparatul lui Golgi este o verigă importantă a transportului intracelular. Dăm un exemplu limpede care poate ilustra această funcţie : în celulele epiteliului intestinal veziculele golgiene, situate deasupra nucleului, încorporează un material polizaharidic, care se asamblează în veziculă împreună cu fosfomonoesterazele alcaline. Apoi vezicula migrează spre suprafaţa apicală a celulei unde se integrează în „bordura în perie". Odată cu vezicula sînt transportate şi fosfomonoesterazele alcaline din ea la microvili.

6.4. ORIGINEA APARATULUI LUI GOLGI

Este destul de bine lămurită în sensul în care dictiozomii se pot forma prin diviziunea sau fragmentarea celor preexistenţi sau în sensul în care se acceptă o trecere a materialului membranar de la reticulul endoplasmatic spre plasmalemă. Aşa, de pildă, analiza chimică a membranelor golgiene arată că ele au o compoziţie intermediară între aceea a reticulului endoplasmatic şi membrana celulară.

La ciuperca patogenă *Pythium ultimum* s-a constatat că plasmalema şi veziculele golgiene sînt intens colorabile cu acetat de uranil-citrat de plumb, fiind amîndouă de aceeaşi grosime (75 Å) şi trilaminate, pe cînd membrana reticulului şi membrana nucleului nu sînt trilaminate, ci monolaminate şi se colorează mai slab fiind şi mai subţiri (25—40 Å). În privinţa cisternelor golgiene, cele de pe faţa formatoare sînt subţiri atestînd originea lor reticulo-endoplasmatică iar cele de pe faţa secretoare sînt groase, întocmai ca şi plasmalema pe care o constituie.

Existenţa aparatului lui Golgi necesită prezenţa nucleului, deoarece după enuclearea unei amibe sau după tratarea amibelor nucleate cu actinomicină-D dictiozomii dispar, dar reapar după 1 oră de la renucleare. După 6—24 ore dictiozomii se multiplică, în timp ce reticulul granulos sintetizează proteinele noilor cisterne golgiene.

Pe de altă parte s-a putut stabili că un dictiozom din celulele caliciforme ale colonului se reface în întregime într-un interval de 20—40 minute, iar o cisternă la fiecare 2—4 minute.

Datorită cercetărilor de citologie întreprinse la celulele plantelor a reieşit clar rolul membranei veziculelor golgiene în timpul diviziunii celulare, care fuzionează prin eccitoză cu plasmalema. Deci plasmalema şi membranele veziculelor golgiene sînt structuri omoloage. De aici decurg şi unele analogii funcţionale în resorbţia, în eliminarea şi în sinteza diferitelor formaţiuni de pe suprafaţa lor. Astfel, plasmalema înglobează activ ioni anorganici şi micromolecule, iar membrana golgiană tranziţionează glucide şi proteine. Amîndouă sînt capabile de exocitoză.

Aşa cum s-a arătat, membrana celulelor sintetizează în diferite cazuri pereţi fibrilari (celuloză, glucani, chitină) şi mielina fibrelor nervoase. Tot astfel şi membrana veziculelor golgiene vegetale sintetizează peretele matricei membranei externe, celuloza la *Pleurochrysis* şi solzii din jurul flagelilor la unele alge.

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie, atît membranele golgiene cît și plasmalema sînt asemănătoare autogenetic și funcțional. Aparatul lui Golgi este un sistem membranar intracelular care are ca principală funcție producerea plasmalemei, atît în cazul celulelor animale cît și ale celor vegetale (fig. 90).

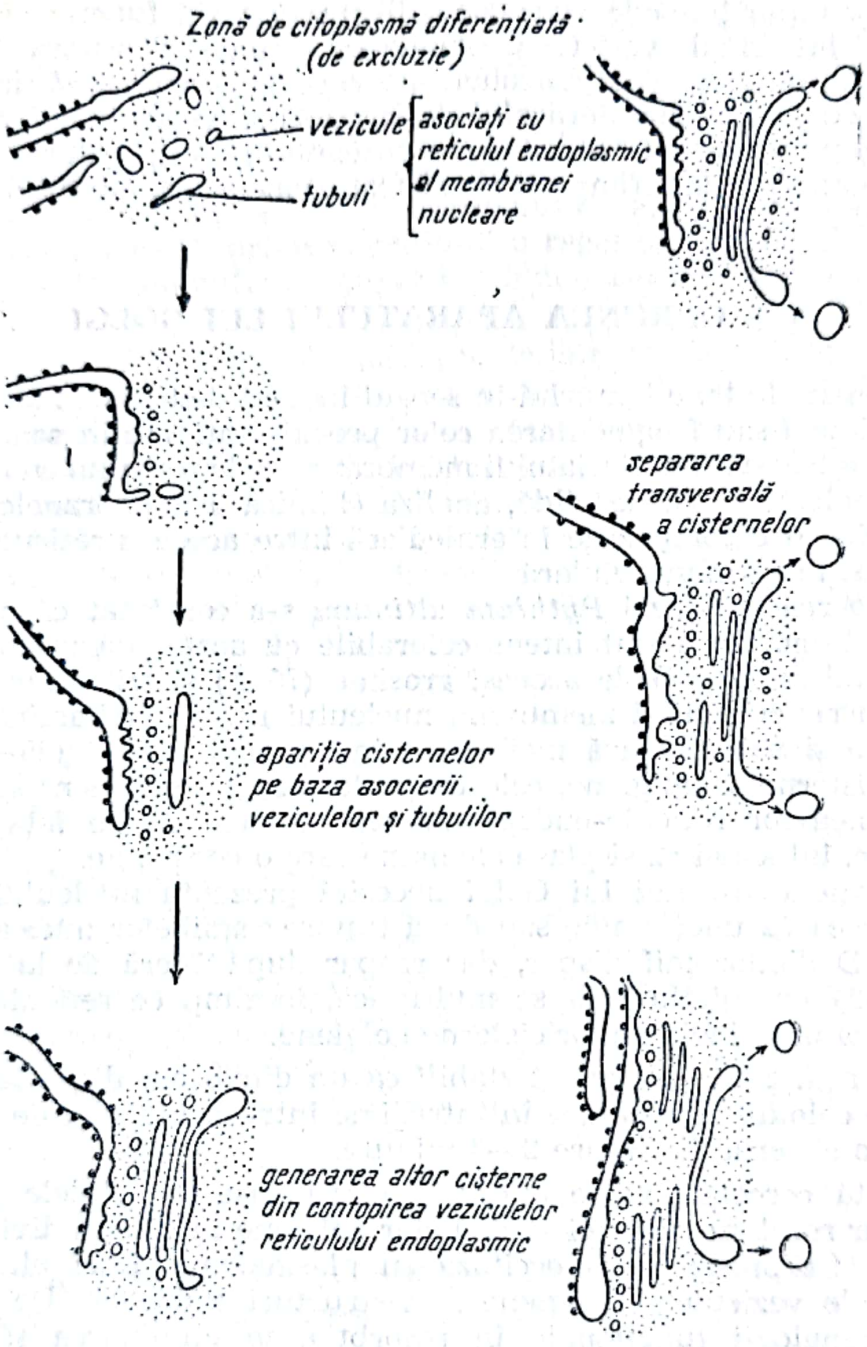

Zonă de citoplasmă diferențiată
(de excluzie)
vezicule
tubuli
asociați cu reticulul endoplasmic al membranei nucleare
separarea transversală a cisternelor
apariția cisternelor pe baza asocierii veziculelor și tubulilor
generarea altor cisterne din contopirea veziculelor reticulului endoplasmic

Fig. 90. Originea aparatului Golgi.

Pentru A. Novikoff cisternele interne golgiene, bogate în tiamin-pirofosfatază, nu au nici o legătură cu vacuolele de condensare, bogate în fosfataze acide, care reprezintă dilatări ale reticulului endoplasmatic. Lizozomii se formează tocmai prin acumularea hidrolazelor acide în vacuole desprinse din reticulul endoplasmatic în vecinătatea aparatului lui Golgi.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

LIZOZOMII

7.1. STRUCTURĂ ŞI ULTRASTRUCTURĂ

În 1951, J. Berthet şi C. de Duve au descoperit în fracţiile mitocondriale hepatice o mare cantitate de fosfataze acide, repartizată la turaţii mari în funcţia microzomală, iar la turaţii ceva mai mici în cea mitocondrială (în ultimul caz se izolează destul de bine mitocondriile de microzomi). Subfracţia mitocondrială uşoară, cum a fost denumită la început, conţine pe lîngă fosfataza acidă şi o serie de hidrolaze acide, ceea ce i-a conferit denumirea de *fracţie lizozomală*.

Studiul electronmicroscopic a arătat că avem de-a face cu o structură bine definită : vezicule de 0,2—0,5 μ înconjurate de o singură membrană fosfolipoproteică (digerabilă de lecitinază), care include o serie de enzime cu *p*H optim = 5.

Punerea la punct a izolării acestei fracţiuni mici, bogată în hidrolaze acide, a fost realizată în multiple variante printre care reţinem schema lui D. Thimes-Sempoux (1968), pentru ficatul de şobolan (fig. 91). Purificarea fracţiei lizozomale se face cu rezultate excelente prin electroforeză fără suport (după K. Hannig, 1964), datorită marii mobilităţi electroforetice către anod a lizozomilor. În felul acesta se poate apoi măsura exact activitatea specifică relativă (fosfatază acidă 40 ; β-glucuronidază 65 ; arilsulfatază 238) raportată la 1 mg proteină (fosfatază acidă 11,6 × 10^3 ; β-glucuronidază 271 × 10^3 ; arilsulfatază 21,4 × 10^3).

Lizozomii se autoactivează la un *p*H = 5 la 37°C cînd „se sparge" membrana, iar hidrolizele acide ies în afară. De aceea, o primă condiţie a extracţiei lor este temperatura de 0°C şi existenţa soluţiilor izotonice dezaharoză. Omogenizările brutale, congelarea şi dezgheţul alternative, detergenţii, enzimele proteolitice etc. rup membrana lizozomilor şi se eliberează conţinutul. Totuşi, şi prin asemenea metode, se pot măsura diferite aspecte ale activităţii lor enzimatice. De pildă, prin tratarea cu Triton X-100 sau digitonină 1% a unei fracţii lizozomale putem măsura potenţialul global activ al unei enzime, obţinînd astfel *activitatea ei totală*. Dacă se sedimentează lizozomii din soluţia de 0,25 M glucoză şi li se măsoară numai activitatea enzimatică, se obţine ceea ce se numeşte *activitate sedimentabilă*. În mediu rămîn totuşi o serie de enzine lizozomale care au difuzat din ei

Scanned with OKEN Scanner

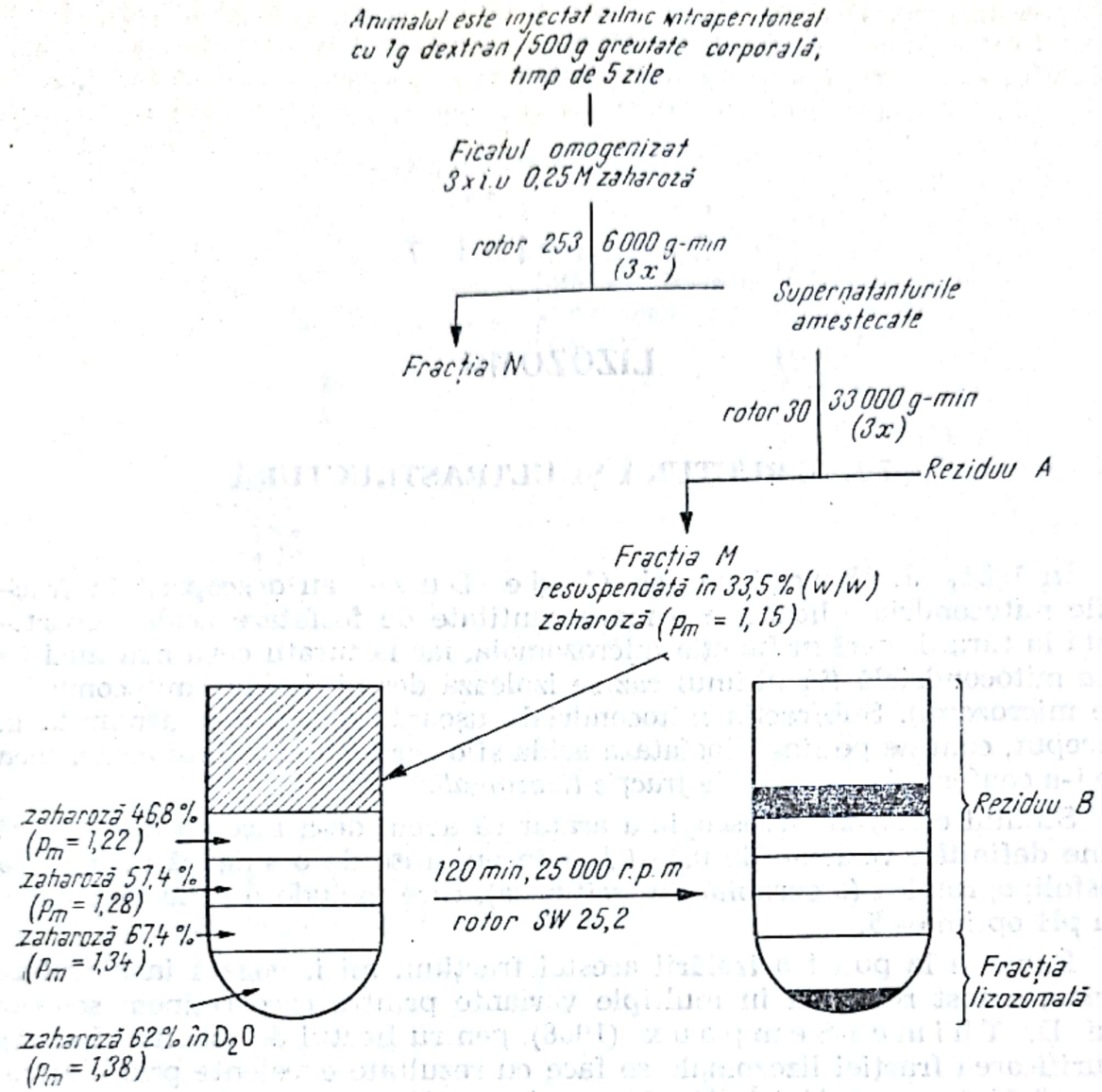

Animalul este injectat zilnic intraperitoneal cu 1g dextran /500g greutate corporală, timp de 5 zile
Ficatul omogenizat 3x i.u 0,25M zaharoză
rotor 25 3 | 6000 g-min (3x)
Fracția N
Supernatanturile amestecate
rotor 30 | 33000 g-min (3x)
Reziduu A
Fracția M resuspendată în 33,5% (w/w) zaharoză (ρ_m = 1,15)
zaharoză 46,8% (ρ_m = 1,22)
zaharoză 57,4% (ρ_m = 1,28)
zaharoză 67,4% (ρ_m = 1,34)
zaharoză 62% în D_2O (ρ_m = 1,38)
120 min, 25 000 r.p.m
rotor SW 25,2
Reziduu B
Fracția lizozomală

Fig. 91. Schema izolării lizozomilor din omogenate, prin centrifugare în gradient de zaharoză.

și care reprezintă *activitatea solubilă*. În fine, *activitatea liberă* a unui omogenat cuprinde atît pe cea solubilă cît și pe aceea a lizozomilor cu permeabilitate parțială.

7.2. ENZIME LIZOZOMALE

Numărul enzimelor lizozomale descoperite în ultimul timp a făcut să crească lista acestora de la 15 la 54 (ribonuclează, mai multe tipuri de esteraze și lipaze, hidrolaze, alanil-CoA, hidrolaza-3-hidroxisobutil-CoA, mai multe tipuri de fosfataze acide, fosfataze fosfatidice și fosfoproteinice, fosfodiesteraze, fosfolipaza-*C*, arilsulfataza-*A* și *B*, mai multe tipuri de condroitinsulfataze, α și β-glucozidaze, lizozim, neuroaminidaza, β și α-galactozidaze, α-manozidaze, β și α-acetilglucozaminidază, α-acetil-galactozaminidaza, β-glucuronidază, hialuronidază, β-xilozidază, α-*L* și β-*D*- fuco-

Scanned with OKEN Scanner

zidază, tioglucozidază, catepsina-A, acetilfenilalanintirosin-hidrolază, carboxipeptidază acidă, dipeptidază, catepsinele B_1, B_2, C_1 și C_2, D și E-colagenaza, proteinază neutră, renină, activatorul kiminogenului, activatorul plasminogenului, naftilamidaza aminoacidică, aspartilglucozilaminază, ceramidază, pirofosfatază, acilfosfatază, fosfoamidază.).

Desigur că arhetipul lizozomic conținea un număr mic de enzime, dar el a crescut pe măsura specializării celulelor în decursul evoluției. În primul rînd a apărut specializarea la sistemul „digestiei" intravacuolare, enzimele lizozomiale la *p*H-ul lor optim acid avînd o rezistență neobișnuită la autoliză. O serie de enzime lizozomale sînt glicoproteine, iar conținutul lor variabil în acid sialic indică existența unor izoenzime cu activități catalitice asemănătoare.

În centrul activ al unor enzime lizozomale un rol important îl au grupările carboxilice. Profilul, în formă de clopot al ratei *p*H-ului catalizei enzimatice, indică faptul că *p*H-ul optim se află între punctele de ionizare a cel puțin două grupări funcționale ionizate din centrul catalitic. Dacă sînt mai acide pot ioniza sub *p*H optim, și pentru enzimele lizozomale aceasta înseamnă că cel puțin una din grupările funcționale va avea *p*H-ul cuprins între 2,5—1 atribuit grupării carboxil. Inactivarea grupărilor carboxilice duce la inactivarea enzimei. În ceea ce privește mediul acid al fagozomilor în cadrul cărora acționează enzimele lizozomale, el este dat de H^+ pompat de ATP-ază sau de o pompare redox, datorită NADH-dehidrogenazei membranei lizozomale.

În afară de lizozomi, J. Rhodin (1954) a descoperit niște structuri asemănătoare bogate în catalază, D-aminoacid-oxidază și urat-oxidază, denumite *peroxizomi.*

Peroxizomii. Pot fi observați în nefronul vertebratelor după injectarea prealabilă cu *peroxidază,* care poate fi evidențiată prin diaminobenzidină la *p*H = 9. Ei au o matrice mai puțin densă, un „nucleoid" întunecat în centru și sînt înconjurați, de asemenea, de o singură membrană ușor încrețită.

Structurile lizozomale sînt foarte polimorfe. Schema dată de A. Novikoff sugerează și originea lor diferită (fig. 92).

S-au descris patru categorii de structuri lizozomale : *a*) granule de acumulări enzimatice ; *b*) vacuole autolitice ; *c*) vacuole digestive și *d*) corpi reziduali.

7.2.1. LIZOZOMII DE ACUMULARE ENZIMATICĂ

Unele vezicule golgiene conțin în multe cazuri hidrolaze acide, de unde și denumirea de *lizozomi primari.* Evidențiați histochimic prin metoda cu acetat de plumb sau prin cuplajul coloranților azoici (fosfat de naftol AS-BI cuplat cu *p*-acetoximeric-anilină diazotată sau tiofosfat de naftol diciclohexilamoniu și albastru direct BBN), asemenea vezicule au fost identificate în aparatul lui Golgi din neuroni, hepatocite, nefrocite, enterocite, epiteliul glandei multifide de la melc, glanda mediointestinală de rac, glanda verde de la rac (fig. 93), *Euglena* etc. O problemă intere-

Scanned with OKEN Scanner

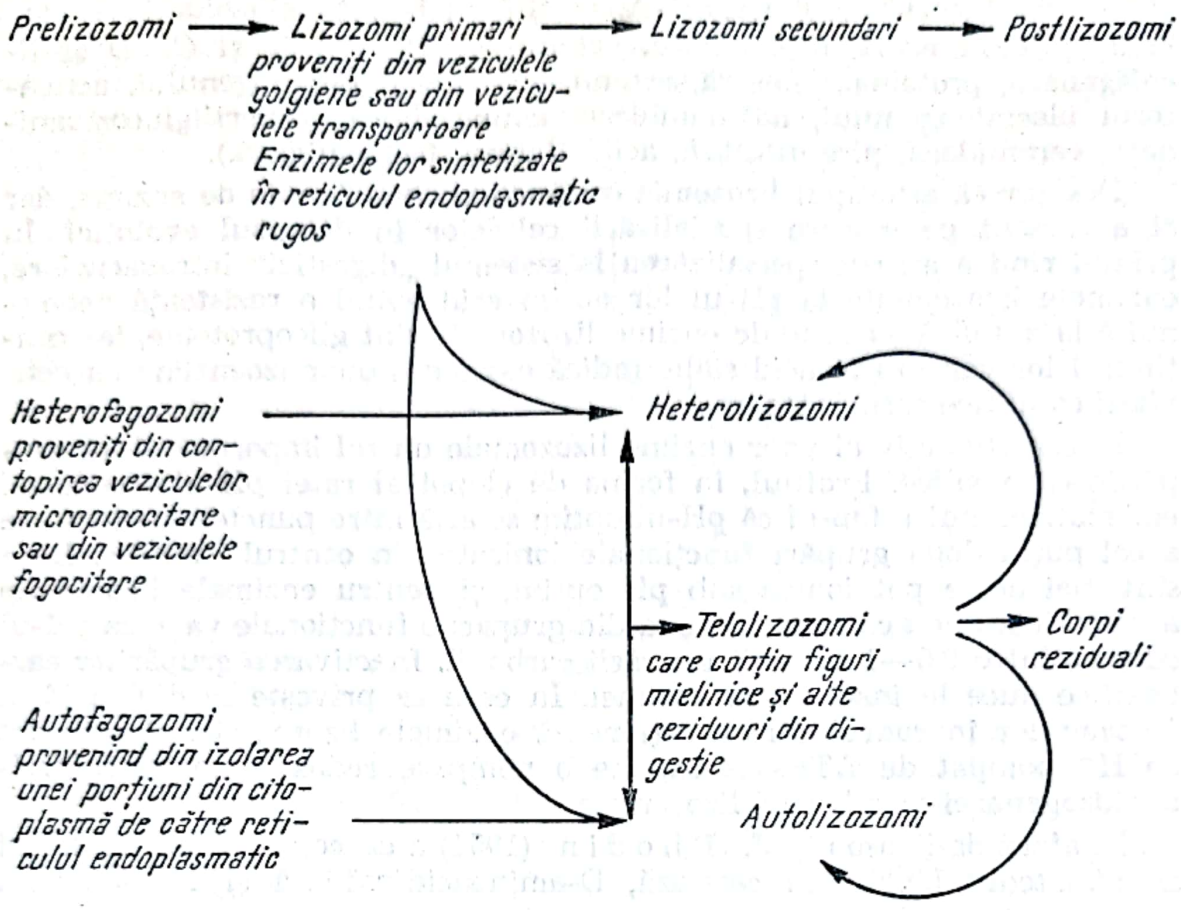

Prelizozomi
Lizozomi primari proveniți din veziculele golgiene sau din veziculele transportoare Enzimele lor sintetizate în reticulul endoplasmatic rugos
Lizozomi secundari
Postlizozomi
Heterofagozomi proveniți din contopirea veziculelor micropinocitare sau din veziculele fogocitare
Heterolizozomi
Telolizozomi care conțin figuri mielinice și alte reziduuri din digestie
Corpi reziduali
Autofagozomi provenind din izolarea unei porțiuni din citoplasmă de către reticulul endoplasmatic
Autolizozomi

Fig. 92. Diferitele componente ale sistemului vacuolar celular (după J. Dingle).

Fig. 93. Lizozomi în glanda verde de rac (x 15 000) (după M. Varo).

Scanned with OKEN Scanner

santă o ridică granulocitele polimorfonucleare la care D. Bainton și M. Farquar (1968) detectează în granulele specifice (secundare) fosfatază alcalină, iar în cele azurofile (primare) fosfatază acidă plus 5-nucleotidază acidă, arilsulfatază, peroxidază, indoxilesterază, β-galactozidază și β-glucuronidază.

M. Baggiolini (1971) a întreprins o serie de cercetări asupra acestor granule pe care le-a izolat prin metoda centrifugării izopicnotice a supernatantului postnuclear și a obținut patru fracții : *1) particule mari,* de 0,5—0,8 μ Ø, dense (d = 1,26), care reprezintă granulele primare azurofile. Ele conțin 50—90% dintre diferitele hidrolaze acide și pot fi considerate lizozomi. Prezintă activitate mieloperoxidazică și conțin agenți bactericizi ; *2) granule specifice,* de 0,25—0,40 μ Ø, mai puțin opace ca primele (d = 1,23). Conțin fosfatază alcalină, 2/3 din lizozim și agenți bactericizi ; *3)* o a treia fracție bogată în β-glicerofosfatază acidă, heterogenă, fiind formată din vezicule mari, particule dense și mici, cu o dublă membrană ; *4)* a patra fracție, bogată în *p*-nitrofenilfosfatază acidă, constă din vezicule mari clare (d = 1,14), sau mici și netede cu un conținut clar.

Corpii denși de acumulare enzimatică au fost descriși în jurul canaliculilor biliari. Ei au o mărime intermediară între veziculele golgiene și corpii peribiliari. În motoneuronii spinali, în hepatocite, în glandele sebacee unde au fost văzuți, iau naștere din aparatul lui Golgi, dar în celulele prostatei iau naștere din reticulul endoplasmatic agranular. Citolizozomii, descriși de Lender (1957) în miocard, sînt corpusculi mari pînă la 3 μ, plini cu microvezicule, fragmente membranare și fosfatază acidă, înconjurați de o singură membrană. Enzimele lizozomale formate de către ribozomi sînt apoi cedate reticulului endoplasmatic, din care se elimină desprinzîndu-se ca vezicule mici pe la capetele lui. Ca dovadă sînt NAD-oxidoreductaza și NADH-DIP-diaforaza, care se găsesc atît pe membranele reticulului endoplasmatic cît și pe aceea a lizozomilor și veziculițelor transportoare.

Ph. Matile (1969) a surprins cum în momentul pătrunderii unor substanțe în hifele de *Neurospora* nucleul capătă această informație și o transmite reticulului endoplasmatic care sintetizează enzimele proteolitice în exces, iar lizozomii constituiți sînt eliminați prin pinocitare inversă. La *Epistalis,* P. Favard a observat cum vacuolele digestive desprinse de citofaringe sînt înconjurate de ergastoplasmă. Cavitățile ergastoplasmei conțin hidrolaze acide ce trec curînd în veziculele pinocitare desprinse din vacuola digestivă. După terminarea digestiei, veziculele pinocitare se deshidratează ratatinîndu-se, astfel că apar ca niște calote ; „deșeurile" care rămîn în vezicule se varsă apoi în vezicule fagocitare mai vechi care, la rîndul lor, își varsă conținutul prin citoproct, în afară.

În glanda multifidă de la melc, L. Hollande și M. Varo (1971) au arătat cum fosfataza acidă apare în reticulul endoplasmatic și, de aci,

Scanned with OKEN Scanner

prin veziculele transportoare mici trece în aparatul lui Golgi de unde apoi enzima iese sub formă de vezicule acoperite, vezicule dense etc. şi îşi varsă conţinutul la polul apical.

7.2.2. VACUOLELE AUTOLITICE

În citoplasmă apar, în condiţiile reglajului activităţii sale, arii de degradare locală, care pot distruge parţial sau total celula. Astfel, la un moment dat, reticulul endoplasmatic circumscrie o sferă de citoplasmă cu mitocondrii, vezicule rugoase şi netede, granule de secreţie etc. În această vacuolă se varsă conţinutul veziculelor mici cu hidrolaze acide elaborate de ribozomi şi astfel se începe liza în special a compuşilor glucidici şi proteinici (fig. 94).

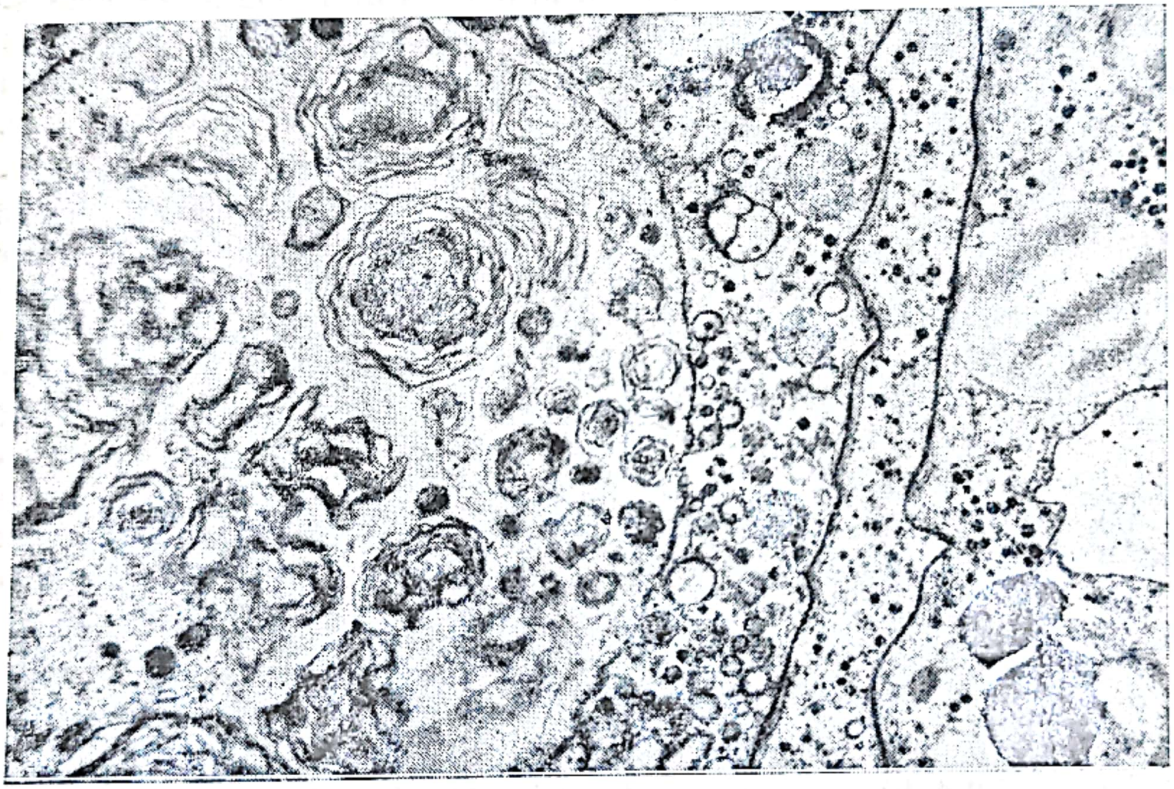


Fig. 94. Lizozomi, glicogen şi un mare autofagozom din glanda intestinală a păianjenului care cruce (x 20 000) (după M. V a r o).

Asemenea *vacuole de autofagie* sînt nişte lizozomi secundari de dimensiuni mai mari (2—3 μ). Ele apar în nefrocite în urma ocluziei venei renale, în hemoglobinurie şi prin legarea ureterelor, în neuronii nervului sciatic după distrugerea acestuia, în enterocitele mamiferelor iradiate, în hepatocitele celor carenţate sau bolnave etc. Asemenea vacuole autolitice „modelează", în sensul plastic al cuvîntului, organogeneza sistemului nervos central, distrugînd anumite porţiuni şi dînd în special posibilitatea formării curburilor sistemului nervos. La embrionii masculi de găină, începînd din ziua a 9-a de incubaţie, s-a demonstrat că regresia cana-

Scanned with OKEN Scanner

lului Müller se face sub influența hormonilor sexuali masculi. Autoliza lui se face sub influența enzimelor lizozomale, așa cum a demonstrat D. Scheib (1961). La canalul lui Müller — mascul — de 8 zile, care n-a intrat în regresie, ca și la cel femel de 8 zile, activitatea solubilă este de numai 10—25%. După aceea, la masculi, activitatea solubilă pentru enzimele lizozomale crește pînă la 50% în timp ce le femele aceasta rămîne constantă și scăzută. În timpul regresiei activitatea totală absolută rămîne invariabilă, fapt care indică menținerea procentajului inițial al cantității totale de enzime. Canalele nediferențiate, ca și acelea de la femele, au aceleași acțiuni litice ca și canalul de la masculi, dar ele se exprimă sub forma sedimentabilă a lizozomilor întregi. Dacă activitatea absolută a canalului de la femele crește progresiv în cursul dezvoltării embrionare, în schimb activitatea specifică rămîne constantă între ziua a 8—10-a, pentru că atunci se sintetizează toate enzimele. Histochimic, se poate dovedi ușor existența lizozomilor ca și conținutul lor enzimatic. Activitatea lizozomilor poate fi declanșată prin hormoni androgeni care acționează asupra canalelor Müller cultivate „in vitro".

Castrația masculilor de mamifere duce la mobilizarea vacuolelor autolitice ale celulelor glandelor prostatice și vezicale, ceea ce produce o regresie a epiteliului glandular.

În privința originii membranei vacuolelor autolizozomilor, ea provine fie din reticulul endoplasmatic, fie din veziculele golgiene. În celulele corpului gras de la omida *Calpodes*, există arii citoplasmatice bogate în reticul endoplasmatic rugos care, la un moment dat, sînt înconjurate de vezicule golgiene. Acestea din urmă se contopesc și formează o membrană continuă a noii vacuole autolitice. Stratul intern al membranei se digeră, iar enzimele hidrolitice cuprinse în interiorul vacuolei își încep acțiunea litică. În alte cazuri s-a văzut cum se formează invaginări înăuntrul reticulului endoplasmatic, incluzînd în ele porțiuni de citoplasmă cu organitele ei. Apoi în aceste vacuole se varsă conținutul unor vezicule cu hidrolaze acide și începe digestia intravacuolară. În multe cazuri în care are loc o autodigestie parțială a citoplasmei sau a produselor sale de secreție, aceasta trebuie privită ca o adaptare la perioadele de „criză metabolică" celulară (fig. 95).

Autodigestia vacuolară reorientează procesele metabolice: în cazul întreruperii lactației se autofagocitează granulele hormonului lactogen din celulele epsilon din lobul hipofizar anterior al femelei; se mobilizează lipidele din țesutul adipos în timpul inaniției; se distrug mitocondriile renale, iar produsele eliberate din focarele autolitice sînt folosite ca stimulatori ai diferențierii celulare.

7.2.3. VACUOLELE DIGESTIVE

Sînt lizozomi secundari a căror membrană provine din plasmalemă și conțin un material exogen care este supus hidrolizei enzimatice. Sînt intrate în uz curent injecțiile cu peroxidază de hrean, coloranți bisazoici

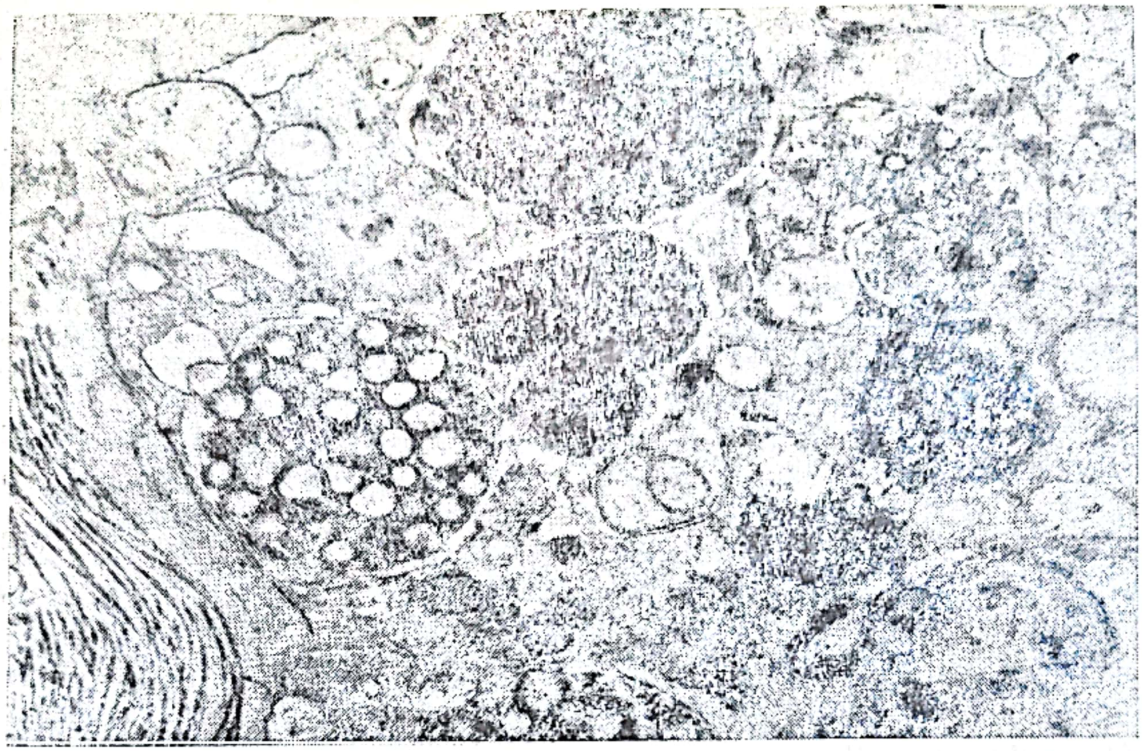


Fig. 95. Vezicule transportoare şi autofagozomi cu fosfatază acidă din pancreasul endocrin de la broască) (x 12 200) (după T. Trandaburu).

acizi (albastru Tripan, albastru Evan) sau cu hemoglobină, substanţe care sînt pinocitate împreună cu albuminele. Înglobarea se face fie prin veziculele netede de pinocitare, care sînt invaginaţii ale plasmalemei (la endoteliul capilar), fie prin caveole acoperite, atunci cînd se înglobează proteine (la celulele sinusoidale hepatice). Pinocitarea lichidelor se poate face şi prin canalicule înguste, care sînt nişte invaginaţii cilindrice ale plasmalemei (pinocitarea vermiculară a celulelor Kupffer). În aceste moduri se transportă substanţele extracelulare în lizozom, luînd naştere *heterofagozomii.* Aprovizionarea cu hidrolaze acide se face prin alte vezicule acoperite, mult mai mici, ce provin din aparatul lui Golgi şi sînt numiţi *lizozomi primari.*

M. I. Varo (1963) a descris dinamica fagocitozei la *Planaria gonocephala,* care se desfăşoară astfel : particulele alimentare aderă la plasmalema polului apical al enterocitelor, în care ele sînt înglobate cu timpul. Hrana este inclusă, împreună cu o cantitate de lichid intestinal, în această vacuolă digestivă iniţială. În primele minute se formează la polul apical al celulelor o mulţime de asemenea vacuole. În timpul unei ore toate celulele intestinale se umplu cu vacuole, iar în 7 ore se fagocitează tot conţinutul lumenului intestinal. Energia acestui proces este dată de oxidarea lipidelor din jumătatea apicală a celulelor care dispar în decursul celor 7 ore. La începutul ingestiei, vacuolele au 6 μ Ø, un contur puţin neregulat şi un conţinut celular palid, eozinofil. După 90 de minute

Scanned with OKEN Scanner

volumul conținutului lichid al vacuolelor se micșorează, vacuola devine sferică, iar conținutul ei se contopește într-o masă granulară. Asemenea vacuole dau reacția pentru esteraze acide, ca și pentru diferite hidrolaze acide, care apar de la începutul digestiei. În primele 4 ore de la începutul fagocitozei, în sferulele granulare apar zone cu o structură omogenă, luînd naștere un al treilea tip de vacuole cu material omogen. Pe măsură ce se digeră hrana, vacuolele se micșorează la 3—4 μ Ø, iar conținutul lor devine din ce în ce mai omogen și mai dens.

7.2.4. CORPII MULTIVEZICULAȚI

Sînt incluziuni heterolizozomale, care rezultă prin pătrunderea veziculelor golgiene întregi în heterofagozomi. Uneori apar înconjurați de reticul endoplasmatic neted, așa cum a arătat M. I. Varo (1969) în glanda medio-intestinală de la rac (fig. 96). M. Farquhar și G. Palade (1962) au surprins în celulele glomerulilor renali pinocitarea feritinei, pe care o regăsesc apoi în corpii multiveziculați. Aceștia mai pot proveni și din transformarea plachetelor viteline din oocitele animalelor. În ei s-au detectat fosfataze acide, datorită cărora au putut fi identificați în enterocite, neuroni, adenohipofiză și oocitele de lamelibranhiate.

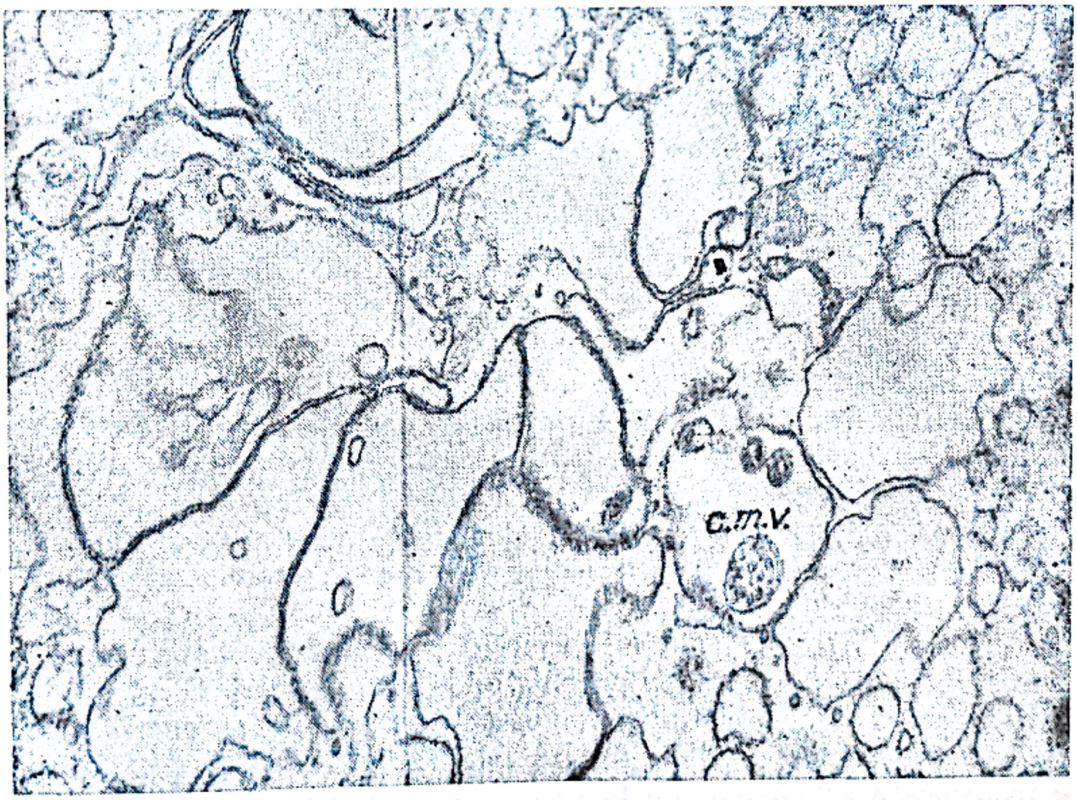


Fig. 96. Corpi multiveziculați (c.m.v.) (x 20 000) (după M. Varo).

7.2.5. CORPII REZIDUALI

Sînt acele particule rămase de pe urma digerării intravacuolare autolitice şi digestive, avînd dimensiuni variabile după vacuola din care au rezultat. Corpii reziduali sînt forme de eliminare a resturilor rămase în urma lizei intravacuolare şi, de aceea, se regăsesc în tot felul de celule care au activitate lizozomală. Pinocitarea hemoglobinei de către nefrocitele segmentului principal al nefronului duce la apariţia a trei categorii de corpi reziduali : *a*) *corpi denşi*, plini de feritină ; *b*) *corpi vacuolari*, cu o vacuolă într-o masă de feritină şi *c*) *corpi lamelari* cu „figuri" mielinice ale lipidelor, care rămîn nedigerate în lizozomi (fig. 97). În canali-

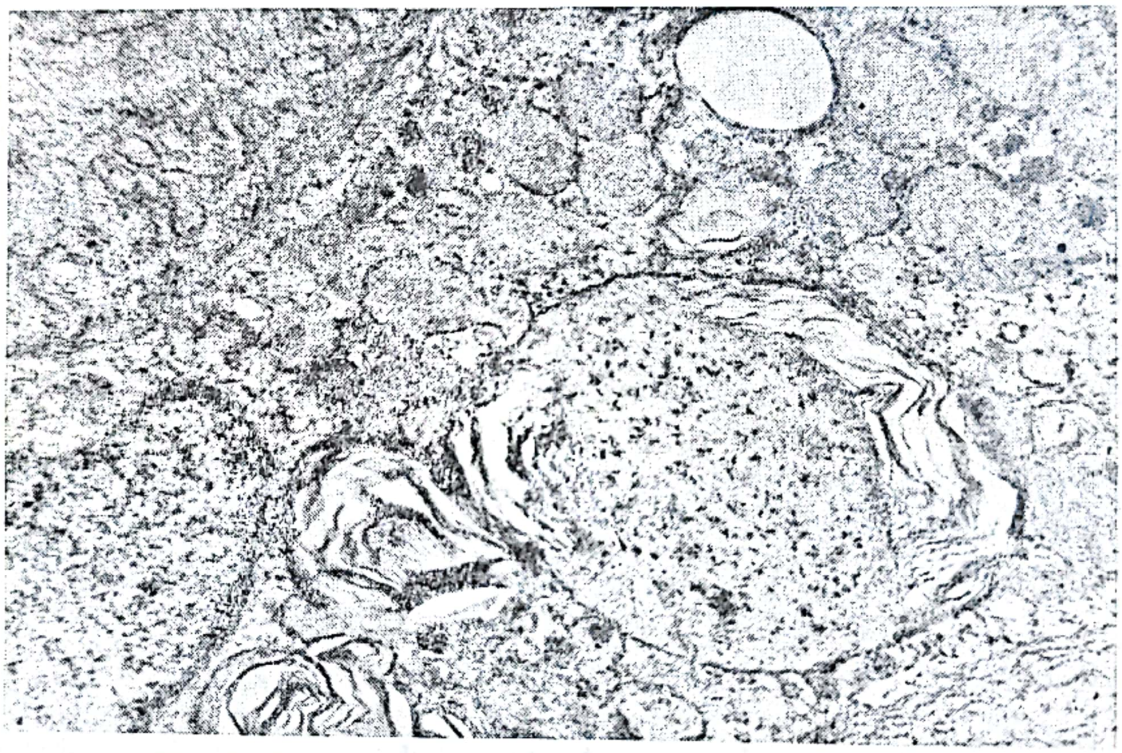


Fig. 97. Lizozomi cu fosfatază (după T. Trandaburu).

culele biliare apar corpusculi de 3 μ Ø cu pigmenţi biliari, iar glanda protoracică a insectelor involuează după ultima năpîrlire prin transformarea conţinutului vacuolelor autolitice în „figuri" mielinice, care reprezintă suita unei dezorganizări celulare caracteristice.

De regulă, majoritatea necrozelor şi efectele unor noxe se termină cu apariţia corpilor reziduali în care se detectează activitatea diferitelor hidrolaze acide.

În concluzie, lizozomii sînt populaţii subcelulare, heterogene, care prezintă fluctuaţii după starea fiziologică şi felul celulei. Ei pot fi consideraţi ca centrii unei activităţi catabolice a căror apariţie este reglată de nucleu prin activitatea proteosintezei ribozomale, dar şi de citoplasmă care translocă aceste particule la suprafaţa celulei unde se descarcă conţinutul lor (fig. 98).

Scanned with OKEN Scanner

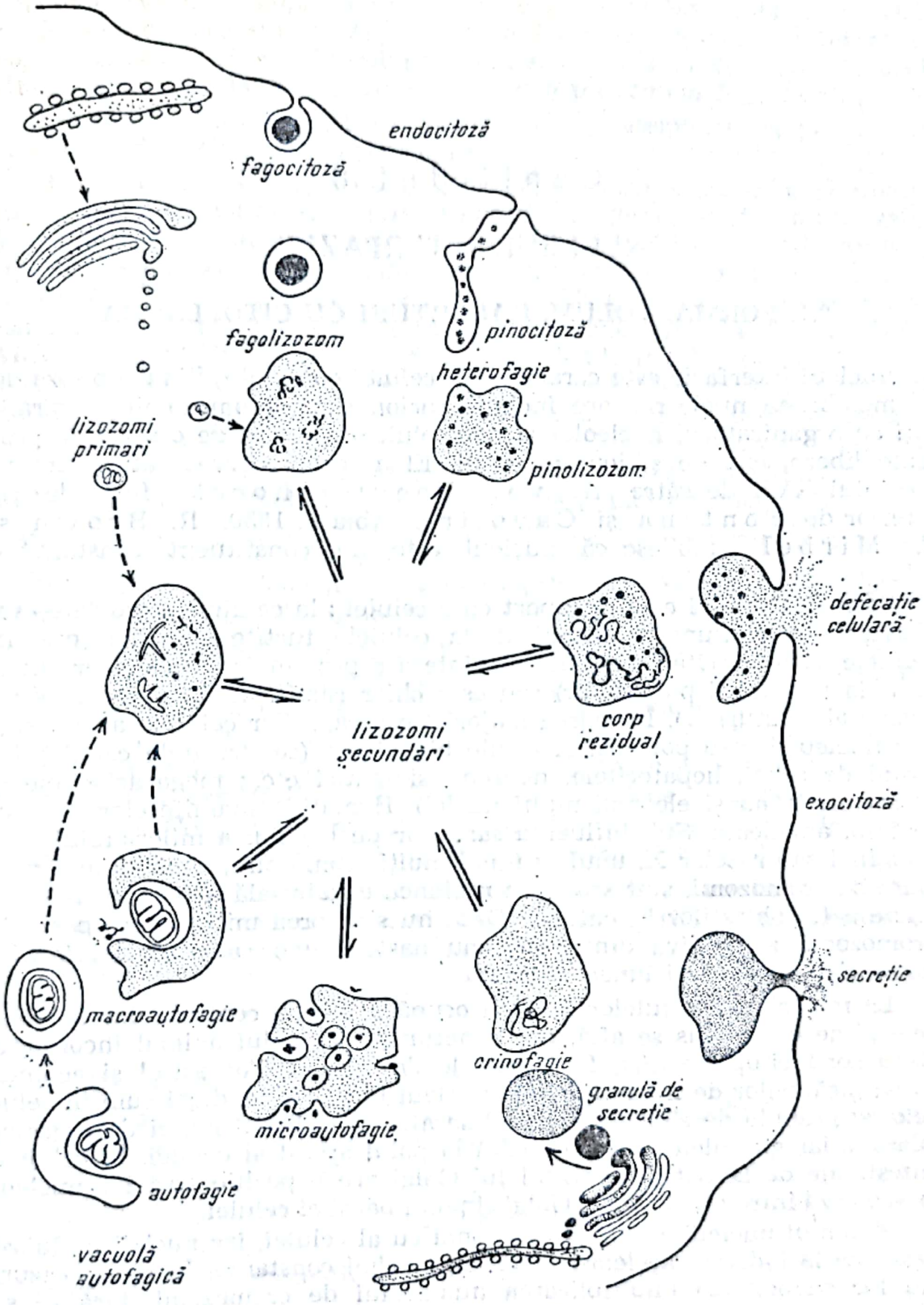


Fig. 98. Funcționarea aparatului lizozomal (după Ch. de Duve).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 8

NUCLEUL INTERFAZIC

8.1. FORMĂ, VOLUM, RAPORTURI CU CITOPLASMA

Nucleul interfazic este caracteristic celulei eucariote, fiind reprezentat de membrana nucleară care include carioplasma, cromozomii despiralizaţi cu organizatorul nucleolar şi nucleolul, precum şi de o serie de proteine libere, enzime şi ioni minerali. El a fost observat către sfîrşitul secolului XVII de către A. von Leeuwenhoeck, fiind descris ulterior de Fontana şi Cavolini. Abia la 1830, R. Brown şi C. Mirbel stabilesc că nucleul este un constituent constant al celulei.

Forma nucleului este în raport cu a celulei : la celulele sferoidale este sferic, la cele alungite elipsoidal, la celulele turtite discoidal etc. În celulele cu o activitate crescută de sinteză a proteinelor nucleul are incizuri (la neoblaştii planariilor) sau este chiar ramificat (la glandele sericigene ale fluturilor). În marea majoritate a cazurilor celulele au un singur nucleu dar se pot găsi şi celule binucleate (condrocitele cartilajului costal de cobai, hepatocitele, neuronii simpatici etc. ; megacariocitele şi osteoclastele au şi ele mai mulţi nuclei). Hematiile mamiferelor sînt, în schimb, anucleate. Sub influenţa sărurilor de beriliu, a mileranului, cisteaminei sau razelor X, unul sau mai mulţi cromozomi, chiar numai porţiuni de cromozomi, sînt scoşi din regiunea ecuatorială a fusului de diviziune a fibroblaştilor în cultură. Dacă nu sînt prea mici, aceste părţi de cromozomi, sau cîţiva dintre ei, dau naştere unor *micronuclei* (nuclei accesorii), după diviziunea celulară.

La majoritatea celulelor nucleul ocupă o poziţie centrală dar la ovocitele pline cu vitelus se află, după maturaţie, la polul animal înconjurat de o zonă citoplasmatică fără granule de vitelus. Tot astfel şi acumularea picăturilor de lipide împinge nucleul la periferie, după cum în celulele cu granule de zimogen nucleul se află în mijlocul masei de ergastoplasmă, iar granulele se acumulează la polul apical al celulei. În celulele intestinale de la triton, aparatul lui Golgi are o poziţie fixă iar nucleul basculează între aparatul lui Golgi şi polul bazal al celulei.

Volumul nucleului este proporţional cu al celulei, iar nucleii aceluiaşi ţesut de la indivizii aceleiaşi specii au mărimi constante. În multe cazuri au loc endomitoze (multiplicarea numărului de cromozomi, fără să se dezorganizeze membrana nucleului) în urma cărora nucleii nedivizaţi au un volum mai mare, corespunzător gradului de ploidie (în ficat, glanda infraorbitrară a rozătoarelor, neuronii Purkinje, ţesutul excitoconducă-

Scanned with OKEN Scanner

tor al inimii etc.). Dacă se grupează nucleii glandei lacrimale sau ai glandei lui Leowenthal după volumul lor, se poate vedea că există maxime de frecvenţe, care sînt în raporturi de 1-2-4-8, reprezentînd tot atîtea populaţii de nuclei. Unele volume de nuclei sînt mai des întîlnite decît altele, astfel că o populaţie de nuclei poate predomina faţă de alta.

Cantitatea relativă de ADN corespunde, de asemenea, la patru clase de nuclei : *di-*, *tetra-*, *hexa-* şi *octoploizi.*

M. I. Varo (1973) a găsit că atît unele nevertebrate hermafrodite, cît şi partenogenetice (*Artemia, Daphnia, Dugesia, Helix*) au o gamă largă de endoploidii atît la organe diferite, cît şi în cadrul aceluiaşi organ. Bineînţeles că şi suprafaţa nucleului este în raport cu cantitatea de ADN, respectiv cu gradul de ploidie. Modificarea genomurilor este consecutivă cu modificările cantitative în histone, proteine acide, ADN şi ARN conţinute în nucleu (larve de amfibieni). În alte cazuri, volumul nucleului creşte datorită măririi cantităţii de proteine din cariolimfă, crescînd în acelaşi timp şi volumul nucleolului dar rămînînd constantă cantitatea de ADN (în neuroni, limfocite, oocite). După un tratament al şoarecilor castraţi cu hormoni androgeni, volumul mediu al nucleilor din segmentul principal al nefronului creşte cu 50% faţă de nucleii animalelor castrate, însă raporturile $\frac{\text{ADN}}{\text{nucleu}}$ şi $\frac{\text{histone}}{\text{nucleu}}$ rămîn constante. S-a constatat însă că ceea ce determină creşterea volumului nucleilor, ca şi starea diferenţierii celulare, sînt proteinele acide.

Funcţia fiziologică a ţesutului respectiv determină volumul nucleilor, ca şi al celulelor. În asemenea categorie de exemple citäm glanda mediointestinală de la moluşte şi de la crustacei, glandele pelviene, tegumentare şi cloacale de la tritoni şi salamandre, celulele luteinice, epiteliul uterin al mamiferelor. Totuşi, în marea majoritate a cazurilor, volumul nucleului şi al cantităţii de ADN este o constantă de ţesut pentru o anumită specie. Ceea ce deosebeşte însă nucleii este cantitatea de apă şi proteine acide care variază după starea fiziologică a celulei.

R. Hertwig a arătat că odată cu mărirea volumului citoplasmei creşte şi volumul nucleului, existînd un raport fix (K) pentru fiecare tip de celulă între volumul nuclear şi al citoplasmei :

$$K = \frac{Vn}{Vc - Vn},$$

în care Vn este volumul nuclear iar Vc-volumul celular.

J. Brachet a calculat „masa activă" a nucleului prin dozarea N din acizii nucleici, astfel că raportul devine :

$$K = \frac{\text{N din ADN} \times 100}{\text{N total} - \text{N din ADN}}.$$

Raportul nucleoplasmatic este cuprins între $\frac{1}{7}$ şi $\frac{1}{10}$, cu limite extreme între $\frac{1}{2}$ şi $\frac{1}{20}$. Dacă raportul este modificat prin mărirea volumului citoplasmei, nucleul intră în diviziune. El este deci în funcţie de hrană, de

fosforilarea oxidativă, de integritatea anabolismului, de factorii de creştere etc., de toţi acei factori care măresc activitatea anabolică, în consecinţă volumul citoplasmei. La rîndul său raportul nucleoplasmatic influenţează ritmul diviziunilor, îmbătrînirea şi degenerarea fiziologică a celulei. Dacă la o cultură din alga *Polytomella* se adaugă sulfamidă, aceasta blochează diviziunile iar flagelatul creşte de opt ori. O asemenea creştere anormală afectează atît nucleul cît şi citoplasma şi poate fi oprită prin adausul vitaminei B, cînd nucleul şi citoplasma revin la volumul lor normal şi flagelatul îşi reia diviziunile.

În interfază cromozomii nu se disting decît parţial prin prezenţa *granulelor de cromatină*. Filamentul lor constitutiv de ADN este mai mult sau mai puţin despiralizat dar, în unele cazuri, o parte din ei sau chiar toţi păstrează structura compactă din metafază : nucleii pahitenici ai glandelor salivare de la diptere, spermatocitele nematodului *Ancyracanthus*, nucleii flagelatelor *Hypermastiginae*, nucleii cu procomozomi de la *Cucurbitaceae* etc.

La unii infuzori există doi nuclei : *macronucleul* trofic şi *micronucleul* generativ. Sînt infuzori marini cu un macronucleu poliploid, omogen şi optic vid observat pe fond întunecat, în timp ce la alţi infuzori de apă dulce macronucleul prezintă granule de cromatină strălucitoare şi imobile. La *Balantidium* aceste granule de cromatină sînt animate de mişcări browniene iar micronucleul este omogen. După felul nucleului conţinutul său este cînd fluid, cînd foarte vîscos, în raport cu tipul celulei şi chiar starea ei fiziologică. Nucleii stratului superficial al epiteliului cornean de la *Rana* sînt clari, omogeni şi optic vizi, pe cînd cei din stratul profund sînt heterogeni şi cu nucleolul vizibil.

8.2. ÎNVELIŞUL NUCLEAR

Acesta separă cromozomii de hialoplasmă, izolînd în interfază, într-un mediu special, materialul genetic cromozomal. Existenţa unei birefringenţe la suprafaţa de separaţie dintre nucleu şi hialoplasmă a fost interpretată mai demult ca o probă a existenţei unei duble membrane, într-o vreme cînd nu exista microscopia electronică. În epoca microscopiei fotonice s-au adus şi alte dovezi asupra existenţei unei membrane nucleare : faptul că nucleul poate fi extras cu acele microdisectorului, sau pipetat dintr-o celulă într-alta în cadrul experienţelor cu grefe de nuclei, sînt probe concludente ale prezenţei învelişului nuclear.

H. Callan şi S. Tomlin (1950) au izolat membrane nucleare din oocitele de amfibieni, pe care le-au întins pe grile de cupru acoperite cu o peliculă de colodiu şi, examinîndu-le la microscopul electronic, au observat că sînt *duble*, cu *pori* şi groase de 500 Å. A. Bairatti şi F. Lehmann (1952) au observat şi ei porii membranei nucleare, interpretîndu-i ca fiind prezenţi numai la foiţa internă. J. Hartmann (1953) a stabilit definitiv pe secţiuni ultrafine că învelişul nuclear este constituit din două membrane groase de 80 Å, delimitînd un spaţiu perinuclear între 200—700 Å. M. Watson (1955—1959) a remarcat pentru prima dată o continuitate între membrana nucleară externă şi ergastoplasmă (fig. 99). Această continuitate este plauzibilă şi prin faptul că

Scanned with OKEN Scanner

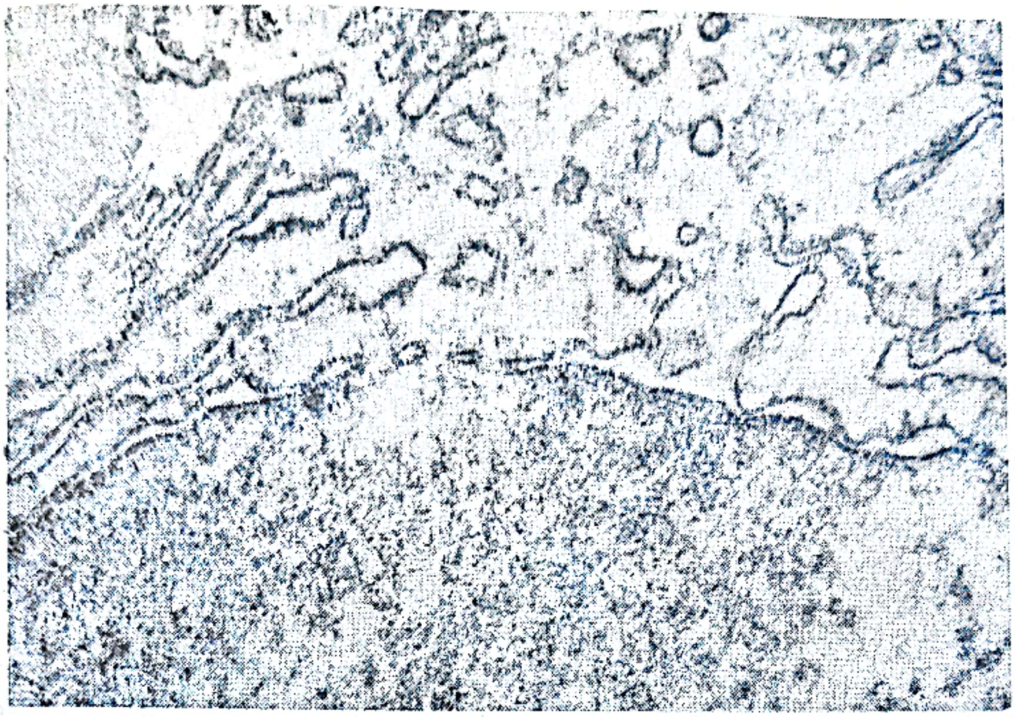


Fig. 99. Legătura dintre membrana nucleară şi ergastoplasmă la *Astacus* (x 30 000) (după M. V a r o).

membrana nucleară externă, ca şi reticulul endoplasmatic, poartă ribozomi. Cu alte cuvinte, spaţiul perinuclear comunică cu cavităţile ergastoplasmei şi, de aceea, a mai fost numit şi *„cisternă" perinucleară*. Unii cred că şi membrana celulară comunică cu ergastoplasma, astfel că nucleul, înconjurat de spaţiul perinuclear, este de fapt în raport prin intermediul cisternelor reticulului endoplasmatic cu mediul extracelular.

Porii care străbat dubla membrană nucleară sînt, în medie, de 10—100 pe μ^2 şi au un diametru între 300—1000 Å, după tipul celulelor. C. F e l d h e r r (1965) consideră că numai particulele mai mici de 160 Å Ø pot trece din nucleu în citoplasmă, foarte încet şi prin mijlocul porilor. Aminoacizii şi alte substanţe nutritive trec uşor din citoplasmă în nucleu, printr-un transport activ, în timp ce structurile ce conţin ARN trec în sens invers, din nucleu în citoplasmă. Deci aceşti pori sînt structuri specializate prin care se realizează trecerea metaboliţilor prin centrul porilor şi în diferite direcţii, după felul substanţelor transportate.

Uneori porii nu au un contur circular ci unul octogonal, de 650—700 Å Ø, cît au porii în urma unei fixări osmice. Porilor le sînt asociate o serie de structuri : *inelul, diafragma* şi *elementele centrale*.

Inelul este format, după W. F r a n k e, din opt subunităţi globulare a căror aşezare face să fie octogonal conturul porului. Există, se pare, o aşezare regulată a opt unităţi sferiodale în raport cu opt porţiuni din circumferinţa porului. Prin criogravură, E. D u P r a w nu a putut vedea asemenea subunităţi veziculare, dar a măsurat la microscopul electronic masa uscată a unui singur inel şi a găsit-o de $5{,}23 \times 10^{-16}$ GM. Aceasta corespunde la o greutate moleculară de 315 milioane, egală cu aceea a 670 molecule de miozină. Se susţine, dealtfel, că inelele se închid

și se deschid modificîndu-și diametrul, la același nucleu, în diferite stadii funcționale ale celulei.

Mulți autori consideră că o diafragmă astupă porul fie continuu, fie prin structuri radiare, adică discontinuu, pentru unii autori fiind un element constant, pentru alții tranzitoriu, în funcție de activitatea celulară. Problema este pusă cu totul altfel de R. Merpham și G. Lane (1969), care interpretează inelele porilor ca fiind poliribozomi în curs de asamblare în timp ce părăsesc nucleul. De aceea, P. Mantré (1966) a reușit să elimine atît inelul cît și granulul central al lui cu ribonuclează. Totuși, atît R. Merriam (1962) cît și J. Beaulton (1968) susțin natura proteică a inelelor și granulelor centrale din mijlocul porilor (fig. 100).

Studiindu-se glanda protoracică a unui lepidopter la microscopul electronic, se constată că materialul electrono-opac asociat porilor membranei nucleare este de natură proteică, iar o parte din acesta este format din enzime, printre care ATP-aza care a fost detectată histochimic de I. Tsubo și G. Jasuzumi (1966) și în nucleii celulelor epiteliale de șoarece.

La suprafața nucleilor de la unele amibe, gregarine, lipitori s-a putut observa un strat fibros gros de 0,3 μ, care dispare în timpul mitozei și este plin de concavități, astfel că ansamblul membranei are aspectul unui fagure de albină. Învelișul nuclear al vertebratelor poartă o *lamă fibroasă*, groasă de 300—600 Å, care se întrerupe la nivelul porilor și care, după D. Fawcett (1966), se continuă cu materialul fibros al

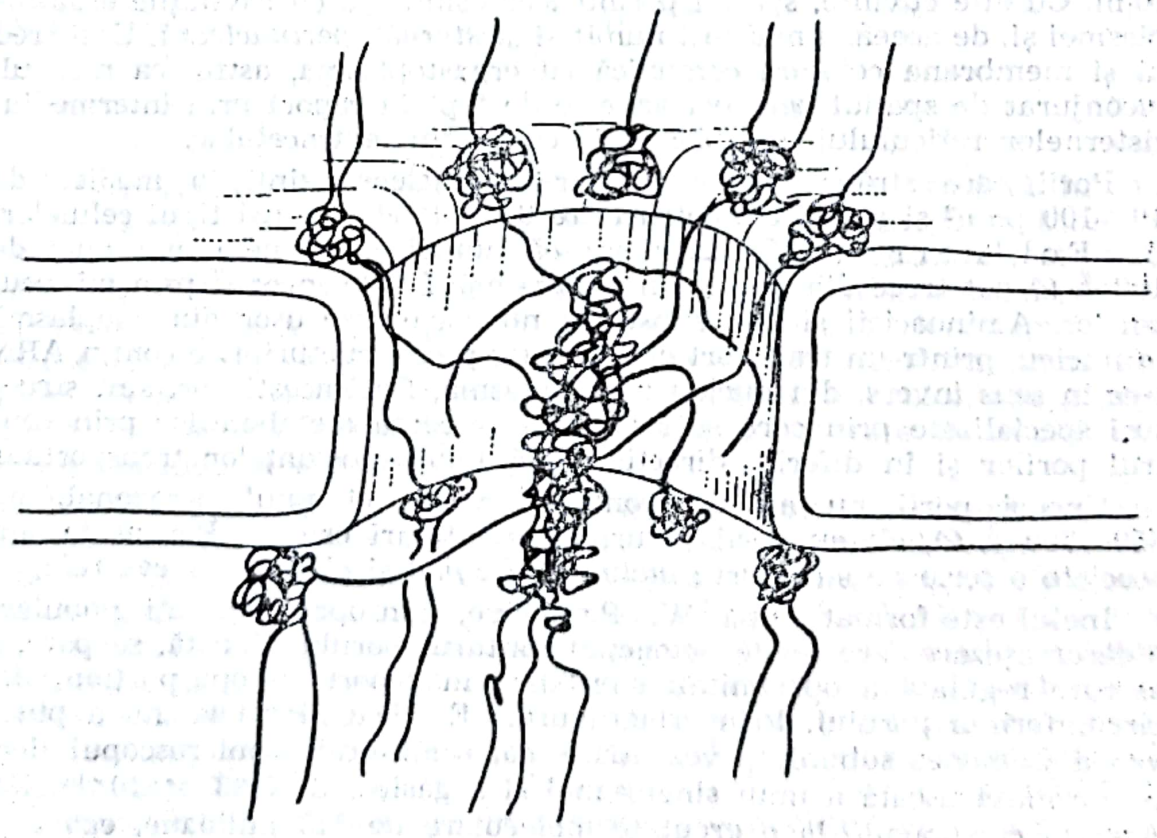


Fig. 100. Diagrama porilor membranei nucleare (după R. Merpham).

Scanned with OKEN Scanner

inelelor porilor. Abia peste această formațiune se găsește membrana reticulului endoplasmatic sau ribozomii liberi.

Este cunoscut faptul că în cursul spermatogenezei de la *Astacus* dispare membrana nucleului, așa încît spermatozoizii nu o mai posedă. Membrana nucleară internă se transformă într-o masă de microtubuli lungi (0,5 μ) iar cea externă în vezicule citoplasmatice. La sfîrșitul oricărei profaze dealtfel, membrana nucleară se fragmentează, trece în citoplasmă și, pierzînd porii, se integrează în reticulul endoplasmatic. Și invers, în cursul telofazei, ergastoplasma se dispune pe masele de cromozomi alipiți și capătă pori. Apoi aceste lame duble se așază cap la cap și refac învelișul nuclear. S-a putut găsi o histonă bogată în arginină de apartenență cromozomală care, în cursul profazei, provoacă dezorganizarea învelișului nuclear.

În 1956 L. Rebhun a găsit în citoplasma oocitelor de *Anopheles* niște lamele cu o structură periodică pe care H. Swift (1956) le-a identificat ca fiind de fapt inelate, la fel ca și membrana nucleară. Fiecare *lamelă inelată* este formată din două membrane care se alipesc la nivelul porilor așezați în mod regulat. Atît dimensiunile porilor, cît și ale inelelor sînt identice cu cele ale învelișului nuclear. Deseori lamelele inelate stau paralele unele cu altele, formînd mănunchiuri puternic bazofile, chiar atunci cînd nu au ribozomi. Ele apar atît în citoplasmă cît și în carioplasmă, mai ales în oocite, spermatocite și celule tumorale, deci în celule în creștere sau în stadiul de multiplicare rapidă. J. Everingham (1968) consideră că lamelele inelate intranucleare din celulele embrionare de ascidii își au originea în fragmente de membrană nucleară, incluse după mitoză, în momentul formării unui nou înveliș nuclear. S-ar putea ca și plierea membranei nucleare să producă asemenea formațiuni intra- sau extranucleare. După R. Kessel (1968) lamelele inelate rezultă din înmugurirea membranei nucleare externe (la oocitele de *Necturus*). Din membrană se desprind vezicule ce se asamblează apoi în citoplasmă formînd lamele. Din membrana internă înmuguresc, de asemenea, lamelele și inelele, ca în nucleul oocitelor de *Triturus*. Dar problema rămîne deschisă, deoarece modalitățile de formare a lamelelor inelate variază cu felul celulelor și a speciilor analizate.

Rolul învelișului nuclear în schimburile nucleoplasmatice. A fost studiat prin stabilirea presiunii osmotice și prin microinjecții în celulele intacte. S-a constatat că numai ionii și substanțele cu o greutate moleculară mică (sub 500) pot să treacă prin membrana nucleară. Sînt însă macromolecule ca ribonucleaza, ARN și histonele care trec ușor din nucleu în citoplasmă. Injectîndu-se în citoplasmă feritină (GM 550 000, 95 Å Ø) se constată apoi la microscopul electronic că ele trec de-a lungul membranei și ajung în nucleu. De asemenea, particulele de aur înglobate în polivinil-pirolidonă, mai mici de 130 Å Ø, intră foarte încet prin membrana nucleară. În schimb, injectîndu-se în oocitele nemature de *Cercopia* γ-globulină marcată cu fluoresceină, aceasta a fost observată la microscopul fluorescent numai în citoplasmă. Din contră, după injecții intravenoase cu γ-globulină (GM 156 000) s-a putut constata prezența ei prin metode imunohistochimice în nucleii diferitelor țesuturi. Tot astfel și antranil-azo-ovalbumina ^{14}C, injectată intravenos, s-a regăsit chiar

Scanned with OKEN Scanner

după 5 minute în nucleii hepatici. $^{24}Na^{+}$ se acumulează și el în nuclei unde se detectează autohistoradiografic, în timp ce K^{+} rămîne în citoplasmă.

Este clar că nu putem vorbi în toate cazurile de aceleași proprietăți ale membranei nucleare, ele fiind deosebite de la caz la caz. Străpungînd membrana nucleului cu un microelectrod constatăm un potențial de +10 mV, care dispare prin alterarea nucleului. Aceasta presupune existența unei încărcături pozitive pe fața internă și alta negativă pe fața externă a membranei nucleare. Dar în oocitele amfibienilor, învelișul nuclear prezintă o rezistență mică la difuzia ionilor, în timp ce la glandele salivare de *Drosophila* și *Chironomus* această rezistență este mai mare, de 1 000—10 000 ori, ca și cum porii ar fi astupați.

Modalitățile trecerii „frontierei" nucleare sînt multiple. În unele cazuri (la oocitele de *Achaeta*, glandele sericigene de la lepidoptere) transferul substanțelor din nucleu în afară se face prin distrugerea unei mici porțiuni din membrană. În alte cazuri (celule secretoare pancreatice, timocite, leucocite) înmugurirea învelișului nuclear în citoplasmă ia o mare amploare, realizînd trecerea unor metaboliți în afara nucleului. I. Zbarski (1969) a arătat că cele două foițe ale membranei nucleare au activități enzimatice diferite și de multe ori acumulează în spațiul perinuclear substanțe care apoi sînt vehiculate în afară sau înăuntrul nucleului. Trecerea prin pori are loc întotdeauna prin centrul lor, datorită inelelor care se leagă cu materialul transportat și care favorizează acest proces de tranzit.

8.3. CROMOZOMII ȘI CARIOPLASMA

Carioplasma reprezintă mediul în care cromozomii realizează dublicarea ADN și transcripția diferitelor ARN. Este foarte adevărat că în multe cazuri nucleul interfazic observat viu nu prezintă cromozomii vizibili, ci numai unul, rar doi nucleoli și cîteodată niște granule de cromatină, adică regiuni plectonematice cu ADN puternic spiralizat și aglomerat în cromozomi. În schimb, în alte cazuri, cromozomii pot fi observați și „in vivo". În primul rînd zoo- și fitoflagelatele, ca și unele protiste, constituie un prim exemplu care sugerează ideea că prin trecerea de la procariote la eucariote s-a realizat uneori un nucleu cu o membrană simplă și totdeauna cu cromozomi asemănători cu cei metafazici, adică foarte condensați. Dar și metazoarele prezintă exemple interesante de vizibilitate a cromozomilor pe viu ca la spermatocitele de la planarii, de la *Phrynotethix*, de la hemiptere, de la gasteropodele pulmonate terestre, ca la nucleii glandelor salivare ale proturelor și dipterelor etc.

La nucleii glandelor salivare, cromozomii omologi se apropie unul de celălalt în regiunile homozigote, dînd impresia că nucleul are un număr haploid de cromozomi. În plus, cromonemele se multiplică atît de mult încît fiecare cromozom devine gigant. Perechea a doua de cromozomi de la *Drosophila* este lungă de 450 μ și groasă de 5 μ, fiind formată din 3200 de cromoneme. La *Chironomus* este formată din 32 000 de cromoneme asociate. Asemenea cromozomi se numesc *politenici*. Pe de

Scanned with OKEN Scanner

altă parte, s-a constatat că nu se observă cromozomi în nucleii vii sau fixați ai blastomerelor embrionilor de nematozi sau din schizonții de *Aggregata;* în schimb, la începutul fiecărei diviziuni, cromozomii ocupă aceleași poziții în interiorul nucleului.

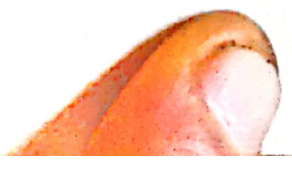
P. Raicu a constatat că la *Mezocricetus newtonii* cromozomii au o așezare preferențială în placa metafazică : la periferia ei se găsesc cromozomul sexual și perechile 3 și 9 de autozomi, iar spre centru perechile 16, 17 și 18 de autozomi. Alte observații similare confirmă faptul că în profază cromozomii au aceleași poziții ca și în telofaza diviziunii precedente. Astfel, din ce în ce mai mult își face loc părerea după care nucleul interfazic conține o anumită organizare spațială a cromozomilor. Aceștia sînt despiralizați dar în cursul mitozei, prin două spiralizări (mică și somatică), devin vizibili prin scurtarea și îngroșarea lor. Ei apar întotdeauna în același loc și au aceleași raporturi de vecinătate în placa metafazică de diviziune.

Lucrările lui M. Barr au pus în evidență o *cromatină sexuală* în nucleii interfazici ai femelelor de mamifere. Ea ocupă întotdeauna un anumit loc în nucleu. De exemplu, în neuronii de pisică, cromatina sexuală se află lîngă nucleol iar în alte celule pe fața internă a membranei nucleare. În decursul dezvoltării embrionare, cînd nucleii au un volum mai mare, cromatina sexuală nu este vizibilă dar mai tîrziu în neuroblaști, ca și în toate celulele embrionare, apare lîngă învelișul nuclear, de unde, în neuronii adulți, migrează pe nucleol. La femeie, această cromatină apare a 16—18-a zi. S-a stabilit că este vorba de o porțiune heterocromatică a unuia din cei doi cromozomi X. Cromatina sexuală ocupă poziții fixe în nucleu. De regulă, cei doi cromozomi X se evidențiază printr-un singur corpuscul de cromatină sexuală, la trei cromozomi X prin doi corpusculi, la patru X prin trei, la cinci X prin patru corpusculi de cromatină sexuală în același nucleu.

Identificarea cromatinei sexuale la om se face ușor pe frotiuri din mucoasa bucală, putîndu-se stabili sexul genetic (cromozomic) și formula genozomică a unei persoane atinse de anomalii sexuale ale cariotipului. Astfel de heterocromatină sexuală se observă la 46—60% din celulele mucoasei bucale de femeie și la 90% din celulele amniotice. Procentajul acesta, ca și volumul corpusculului Barr, variază cu ciclul menstrual, după tratamente cu antibiotice, cortizon, ACTH etc.

Cromozomii reprezintă singurele elemente permanente ale nucleului. Numărul lor este constant, iar forma caracteristică pentru fiecare specie : omul are 46, gorila 48, maimuța *Macacus rhesus* 42, cîinele 78, calul 66, măgarul 62, catîrul 63, șobolanul 42, șoarecele 40, găina 78, șopîrla verde 38, crocodilul 32, broasca 26, crapul 100, drosofila 8, ascaris 4, planaria (*P. gonocephala)* 16, grîul 42, dalia cu flori portocalii 32, tutunul 48, bumbacul 52, crinul 12, unele protozoare peste 300, iar alga conjugată *Netrium* 500 etc.

În decursul evoluției unor specii s-a produs o multiplicare a genomurilor prin poliploidie. Interesant este cazul dinoflagelatelor care au un număr variabil de cromozomi, datorită condiției lor haploide, cu prezența unei singure grupe de „linkeri". Se presupune că există, în realitate, redundanță a unui singur cromozom care „se copiază" variabil, pînă la 40 de



ori. La gimnosperme, speciile *poliploide* reprezintă abia 4,6% din totalul speciilor, dar angiospermele sînt 35% poliploide. Din 12 000 de specii de dicotiledonate studiate, 43% sînt poliploide și din 5 000 de monocotiledonate, 58%. Gramineele sînt 75% poliploide. Schimbările bruște de temperatură, blocarea asamblării macromoleculelor de tubulină în fusul de diviziune, diviziunile celulare anormale sub influența radiațiilor etc. reprezintă cauzele poliploidizării. Formele poliploide ocupă arealuri diferite de acelea ale formelor diploide, mai largi și mai variate. *Valeriana officinalis* are forme diploide în cîmpiile Europei și Asiei și forme tetra- și octoploide adaptate la soluri acide, uscate, la altitudini mari etc. Este de remarcat că animalele partenogenetice sau hermafrodite prezintă o variație foarte mare a ADN repetitiv caracteristică fiecărui țesut (*Artemia salina*) sau chiar diferită, în cadrul aceluiași țesut (*Helix pomatia*), așa cum a arătat M. Varo (1974).

De un real folos în aprecierea gradului de ploidie și în determinarea cantității absolute de ADN în nucleu sînt *metodele citofotometrice* folosite de M. Atkin, G. Mttison, W. Becak, S. Ohno, iar la noi de M. Varo. În felul acesta s-a putut stabili că, din acest punct de vedere, mamiferele placentare formează un ansamblu foarte omogen. Într-adevăr, *Microtus oregoni* ($2n = 18$) și *Canis familiaris* ($2n = 78$) au ambii $7{,}0 \times 10^{-9}$ mg ADN per nucleu, valoare care a fost luată ca referință. Păsările formează și ele o grupă uniformă a cărei cantitate de ADN este cuprinsă între 44—59% din valorile găsite la mamifere. Reptilele au două ramuri: *Squamata*, pe de o parte, cu un procentaj de 60—67% ADN și *Chelonieni-Crocodilieni*, pe de altă parte, cu 80—89%. La pești, în schimb, găsim o mare heterogenitate de valori care reflectă originea lor polifiletică: cyrinodontidele au 20% ADN, percidele 30—35%, clupeidele 40%, cyprinidele 50%, salmonidele 80%. Cefalocordatele au valorile de ADN mici, ajungînd abia la 17% din cantitatea de AND a mamiferelor. M. Gas (1970) presupune că strămoșii peștilor au avut un cariotip diploid format din 48 cromozomi acrocentrici mici, cu o cantitate de 20 ADN și altul triploid din care au derivat percidele. Plecînd de la acest strămoș, speciația s-a realizat în felul următor:

1) *fără schimbarea numărului de cromozomi:*
   — prin mutații alelice;
   — prin duplicarea genelor;
   — prin translocări și pierderi de brațe cromozomale:

2) *cu schimbarea numărului de cromozomi:*
   — prin fragmentarea sau alipirea cromozomilor (cu centromerul situat în regiunea terminală a cromozomului) cînd, de pildă, doi cromozomi mici acrocentrici pot să se alipească la nivelul centromerului și să dea un cromozom mare, metacentric (cu centromerul situat în regiunea mediană a cromozomului) prin alloploidizare datorită pierderii sau cîștigului unuia sau mai multor cromozomi în decursul unor disjuncții defectuoase anafazice;
   — prin poliploidizare.

Scanned with OKEN Scanner

Mărindu-se gradul de ploidie (şi prin hibridări) se realizează o evoluţie rapidă, cum este cazul speciei octoploide *Dahlia variabilis* ($2n = 64$). Ea este originară din Mexic, unde era cultivată de azteci. În cadrul acestui gen există mai multe specii cultivate, care provin dintr-o specie diploidă necunoscută ($2n = 16$). Din specia diploidă, acum dispărută, s-au format specii diploide hibride ($2n = 16$) din care apoi s-au separat două mari grupe de specii tetraploide ($2n = 32$ şi $2n = 32$), una cu florile ivoar şi alta cu florile portocalii. Din hibridarea celor două grupe apare o specie octoploidă (*Dahlia variabilis*: $2n = 64$). Este interesantă variaţia cantităţii de ADN din cromozomi, fără ca numărul lor să se schimbe. De pildă, *Lolium perenne* ($2n = 14$) prezintă în nuclei o cantitate de 31,3% ADN, *Lolium temulentum* ($2n = 14$) are nuclei cu mai mult ADN (42,1%) iar hibridul interspecific, tot diploid, are 36,6% ADN per nucleu. Studiindu-se cantităţile de ADN din nuclei şi din fiecare pereche de cromozomi la trei broaşte: *Bufo bufo*, *B. viridis* şi *B. calamita* ($2n = 22$) s-a găsit o variaţie a cantităţii de ADN în nuclei după următorul raport: 1,49 : 1,17 : 1,00. *Bufo bufo* are, dealtfel, şi nucleii mult mai mari decît celelalte. La alte broaşte ca *Rana temporaria*, *R. arvalis*, *R. esculenta*, toate au acelaşi număr de cromozomi ($2n = 24$), dar la fel apare un raport diferit (1,00 : 1,28 : 1,54) între cantităţile lor de ADN nuclear.

R. Matthey (1964) a descoperit la o specie de şoareci africani din genul *Mus* un proces robertsonian de speciaţie. Sînt populaţii mici de *Mus minutoides* la care indivizii intersterili au un număr variabil de cromozomi (30 ; 31 ; 32 ; 33 şi 34) datorită unor restructurări ale heterozomilor. Această specie reprezintă prima etapă de formare a ei, deoarece a doua etapă este realizarea unor specii bine diferenţiate şi stabilizate. Este vorba de *Mus minutoides indutus* ($2n = 36$) la care cromozomii sînt acrocentrici şi *Mus minutoides minutoides* ($2n = 18$) cu cromozomi metacentrici.

Sînt interesante experienţele făcute pe şobolani ţinuţi 15 ore la 4°C. Temperatura scăzută antrenează şi o pierdere a ADN nuclear în celulele suprarenalei, proporţională cu lungimea timpului de expunere la rece. Animalele ţinute la —32°C timp de 300 de ore pierd mult ADN dar, după 36 ore, cantitatea acestuia creşte brusc fără să atingă valoarea din celula normală. La peste 400 de ore de frig se opreşte sinteza ADN din nucleu şi celulele acestor animale reîncep pierderea de ADN.

Structura şi ultrastructura cromozomilor. J. Finean a imaginat o schemă a structurii cromozomilor (metafazici) bazîndu-se pe datele microscopiei fotonice (fig. 101). În diagrama lui Finean *centromerul* apare ca o granulă închisă înconjurată de o regiune ceva mai clară. Centromerul reprezintă constricţia primară care împarte cromozomul în două braţe, fibrele fusului orientînd şi segregînd cromozomii în anafază (există mutaţii de cromozomi care nu au centromer şi care nu se pot mişca spre polii fusului). Fiecare cromozom este format dintr-o *cromatidă*, constituită la rîndul ei din două *cromoneme*. În cromozomii metafazici se găsesc două cromatide care se separă în anafază. Cromonemele suferă o dublă spiralizare în cursul metafazei: o primă spiralizare minoră şi o a doua somatică, ce are drept consecinţă scurtarea şi îngroşarea cromozomilor.

Scanned with OKEN Scanner

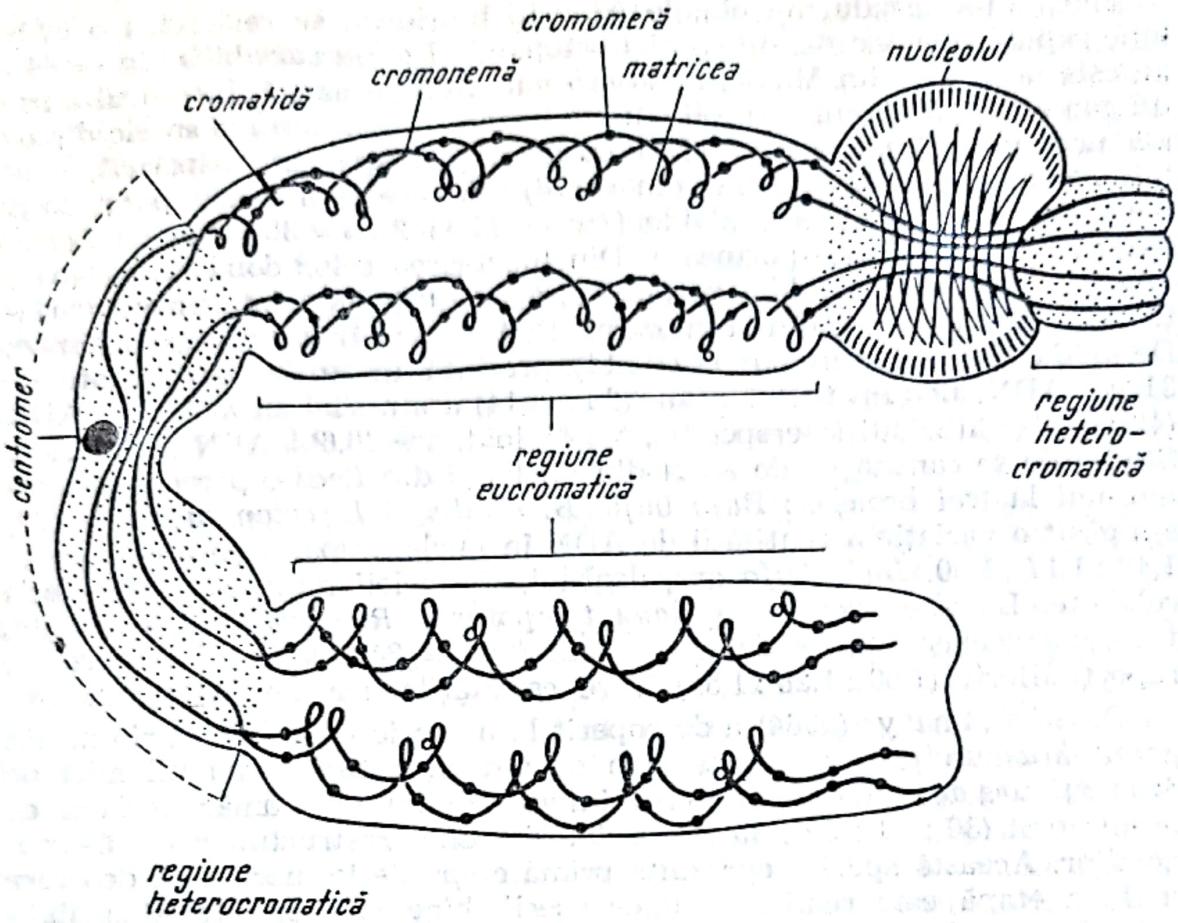


Fig. 101. Structura cromozomului (diagramă după J. Finean).

E. du Praw a făcut studii electronmicroscopice cantitative asupra cromozomilor umani și a găsit că fibrele interfazice de cromatină au un diametru de 230 Å, iar pe o lungime de 1μ au o greutate de $6{,}1 \times 10^{-16}$ g și conțin 30% ADN care se prezintă ca un dublu helix de 50μ. Deci, pe lungimea de 1μ a unei fibre de cromatină cei 50μ ADN sînt „împachetați", după cum se exprimă du Praw, așa explicîndu-se de ce 1,824 m ADN cît au fibrele cromozomilor umani încap, datorită împachetării lor, într-un nucleu diploid uman (fig. 102).

Du Praw apreciază că ADN-ul fibrei cromatinei cromozomale este reprezentat printr-un *singur dublu helix Watson-Crick*, foarte mult împachetat, sub forma superrăsucirii duble. Aceasta explică de ce un dublu helix de ADN de 20 Å Ø, lung de 56 μ, se răsucește odată formînd o fibră de 80—100 Å Ø, lungă de 7—8 μ, care apoi se suprarăsucește încă o dată dînd o fibră de 230 Å Ø și lungă de abia 1 μ.

Într-adevăr, la microscopul electronic, Du Praw și Bahr au găsit o singură clasă de *fibre A* de o grosime intermediară între aceea a simplului dublu helix Waston-Crick (80—100 Å) și a fibrelor foarte mult împachetate de 200—500 Å Ø, denumite *fibre B*. Unele fibre de cromatină conțin regiuni alternative de fibre *A* și *B*, în așa fel încît subfibrilele se înfășoară în cadrul unui spațiu de 400 Å, formînd tipul *B*. Fibrele *A* conțin 1,7 g/ml ADN și un procentaj mai mic 1,2 g/ml) de proteine

decît fibrele *B*. Atît fibrele *A* cît şi cele *B* conţin histone bogate în lizină, în timp ce numai fibrele *B* au histone bogate în arginină şi proteine nehistonice. Dacă în interfază rata împachetării este de 56 : 1, în timpul metafazei ea devine 100 : 1 (tab. 10).

În unele cazuri se constată o aşezare circulară a cromozomilor în placa metafazică, aceştia fiind legaţi unul de altul prin fibre de natură cromozomală. Cu acul unui microdisector se pot extrage cromozomii dintr-o celulă vie în metafază, în care caz se constată o derulare succesivă a cromozomilor. Ei apar astfel înşiraţi de-a lungul unui filament ce-i solidarizează. Fiecare pereche de cromatide se prinde de următoarea printr-un filament orientat către regiunea sa centromerică, aşa că totul se derulează sub forma unui lanţ de 300 μ lungime, iar cînd i se dă drumul din acul microdisectorului lanţul se contractă ajungînd la 100 μ lungime. Dacă asemenea lanţ este tratat cu RN-ază sau pepsină, lanţul cromozomal rămîne intact dar pierde posibilitatea de a se contracta după întindere. Digestia cu DN-ază provoacă fragmentarea lanţului şi separarea cromozomilor individuali.

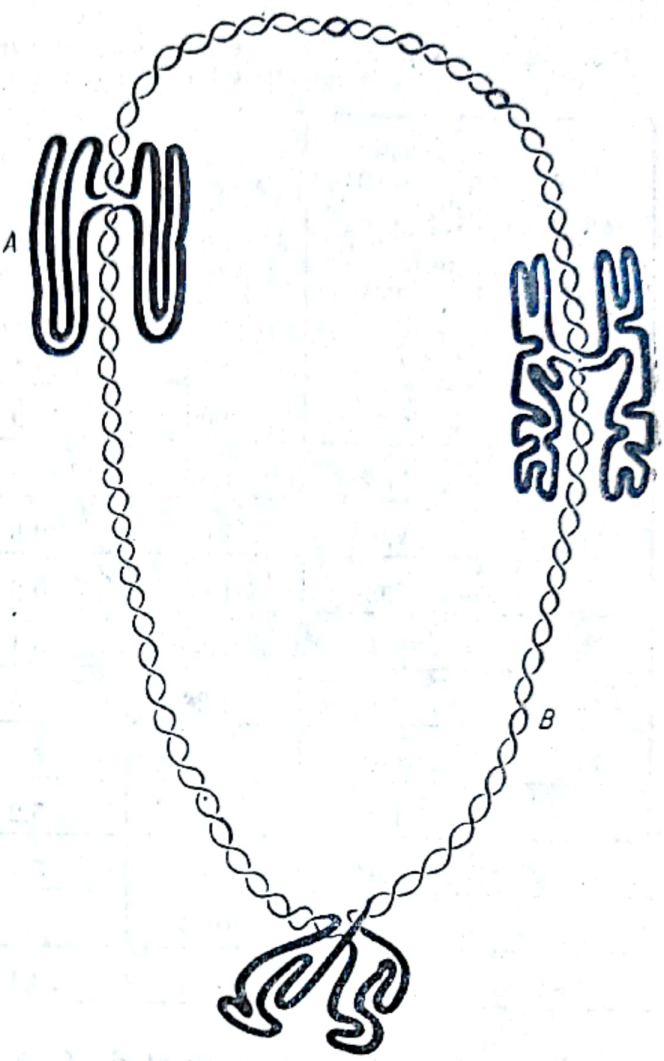


Fig. 102. A — aspectul de supraînfăşurare a cromozomului ; *B* — configuraţia radiară a cromozomilor în concepţia lui E. du Praw.

8.4. NUCLEOLUL

Este locul unde se aglomerează ARN cu greutate moleculară mare, care se formează prin transcripţia pe o anumită porţiune a unui cromozom, denumită *organizator nucleolar*. Nucleolii produc precursorii ARN ribozomal (40S şi 30S ARN), care vor da 28S şi 18S *r*-ARN. ARN-*s* cu greutatea moleculară mică : 5S ARN, 7S ARN, ARN bogat în acid uridilic, precum şi un *m*-ARN necesar sintezei proteinelor şi enzimelor nucleolare sînt transcrişi pe cromozomi.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 10

Distribuţia ADN şi masei uscate a cromozomilor în raport cu lungimea fibrei din cromozomii cariotipului uman (după D u P r a w)

Cromozomii	% absorbţia cantităţii diploide la 257 nm[1] per unitate de cromatidă	Masa absolută de ADN per unitate de cromatidă (10^{-13} g)	Media masei totale per unitate de cromatidă în metafază	Lungimea helixului de ADN per unitate de cromatidă (cm)	Lungimea maximă a fibrei interfazice de 230 Å (mμ)	% ADN în cromatide în lungul braţului
1	4,19	2,35	15,7	7,3	1306	53
2	3,74	2,09	13,9	6,5	1161	60
3	3,32	1,86	12,4	5,8	1033	56
4–5	2,90	1,62	10,8	5,0	900	70
6	2,68	1,50	10,0	4,7	833	—
7–10	2,45	1,37	9,1	4,3	761	66
11–12	2,28	1,28	8,5	4,0	710	—
13–15	1,39	1,00	6,7	3,1	556	86
16	1,44	0,78	5,2	2,4	433	60
17–18	1,44	0,81	5,4	2,5	450	66
19–20	1,12	0,63	4,2	1,9	350	60
21–22	0,82	0,46	3,1	1,4	256	79

Observat pe viu, în contrast de fază, nucleolul are o culoare gălbuie, care-l delimitează net de restul conţinutului nuclear. De regulă, în celulă se găsesc unul sau doi nucleoli de formă sferică sau neregulată. În culturi celulare vii se poate observa cum nucleolii se deplasează şi îşi schimbă încet forma, venind din cînd în cînd în contact cu membrana nucleară. În unele tipuri de celule, în interiorul lor apar granule mici *(nucleolini)*, mai mult sau mai puţin grupate, cu aspectul unei reţele care, de asemenea, se modifică în timp. Alteori conţin şi o vacuolă tranzitorie. Cînd metabolismul respirator este modificat prin dinitrofenol, la culturile de celule modificările de formă sînt mai rapide, nucleolul se alipeşte mai des de învelişul nuclear şi, cu timpul, scade în volum.

Izolarea în stare cît mai bună a nucleolilor a permis o analiză chimică precisă : ADN 3—18% (inclusiv cromatina asociată organizatorului nucleolar), ARN 3—13%, proteine 82—97% (astfel că raportul dintre proteine/ARN este, în medie, de 11,5/1), precum şi o serie de enzime.

Studiul citochimic ultrastructural al nucleolilor „in situ" sau izolaţi a stabilit prezenţa acizilor nucleici şi a proteinelor în structurile nucleolare. ARN se găseşte sub formă de granule şi fibrile ce apar contrastante în urma fixării cu tetraoxid de osmiu şi colorării cu uranil şi

[1] *nm* = nanometru sau milimicron = 0,001 μ.

Scanned with OKEN Scanner

plumb, iar ADN este prezent în mănunchiurile de fibrile care pătrund în nucleol din cromatina asociată lui. Proteinele constituie o matrice de fibrile foarte fine în care se află componentele cu ARN. Atît ARN cît și ADN încorporează precursori marcați.

În multe celule se observă la microscopul electronic o *nucleolonemă* formată din elemente fibrilare, de 0,1 μ Ø sau mai mari, care se anastomozează, depunîndu-se într-o masă mai mult sau mai puțin compactă. Ea este formată din ARN și este localizată într-o matrice amorfă. Printre nucleolonemă se găsesc *arii luminoase* de diferite mărimi. Structurile cu ARN apar granulare și fibrilare în unele cazuri, cu granulele periferice și fibrele în nucleolonema centrală ; în alte cazuri, nucleolonema fibrilară este dispusă la periferia nucleolului (fig. 103). Cromatina poate pătrunde în acest tip de nucleoli formînd septe marginale.

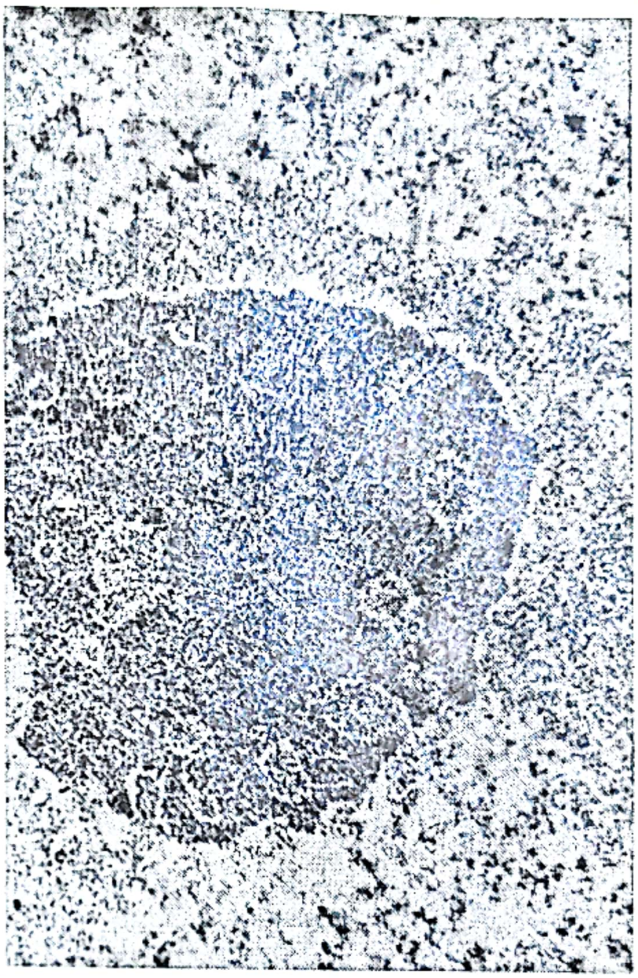


Fig. 103. — Nucleol din nucleii glandei digestive de scorpion.

Alt tip de nucleoli se prezintă *compact*, fără nucleolonemă și cu o distribuție uniformă a structurilor ce conțin ARN. Acest aspect îl au celulele tratate cu actinomicină-D sau tioacetamidă, ca și corpii nucleoloizi din cursul mitozei.

Al treilea tip de nucleoli este acela cu un înveliș de ARN și proteine care include un miez de fibrile. Se întîlnește la mamifere, ca rezultat al maturării și diferențierii celulare ; miezul este tocmai materialul cromozomic nucleolar care, în telofaza tumorii ascitice Ehrlich, persistă împreună cu învelișul de ARN.

În sfîrșit, la unele salamandre americane se întîlnesc nucleoli *circulari* în timpul oogenezei, care conțin un miez de ADN circular învelit de ribonucleoproteine.

Citochimic, au fost detectate la diferiți nucleoli fosfataze alcaline specifice și nespecifice, 5′-nucleotidază, ATP-ază, glucozo-6-fosfatază, guanozin-trifosfatază, succinic-dehidrogenază și colinesterază (în nucleolii neuronilor, hepatocitelor, carcinomului ascitei Ehrlich, meristemul de ceapă), iar biochimic au fost puse în evidență principalele enzime implicate în sinteza ribonucleoproteinelor: ARN-polimeraza, necesară transcripției ARN pe *r*-ADN-ul organizatorului nucleolar și o convertază, care clivează

Scanned with OKEN Scanner

40S ARN în 30S și 28S ARN. Probabil că reacții de clivare au loc și pentru 30S și moleculele mici, de 7S, 8S și 5S ale ARN. S-au evidențiat apoi o ribonuclează liberă și latentă, sintetaza acidului poliriboadenilic și NAD-pirofosforilaza implicată în repararea ADN.

8.5. DINAMICA CITOCHIMICĂ A NUCLEILOR

A fost studiată pe culturile de fibroblaști și de celule tumorale prin metode citofotometrice, de microscopie interferențială, de dozare biochimică a nucleilor sau a cromozomilor izolați și prin marcaje cu radioizotopi.

Măsurătorile realizate de R. Bassleer cu microscopul interferențial privind greutatea totală uscată a nucleilor vii din culturi au arătat că fibroblaștii de pui de găină au 17,9 pg [1] iar cei de șoarece și șobolan 35,8—40 pg. În urma fixării prin înghețare-substituție, cantitatea de proteine totale ale nucleilor imediat după diviziune este de 15 pg, ceea ce reprezintă greutatea diploidă posttelofazică în proteine pentru nucleii de pui. Nucleii de șobolan au o greutate totală de 25—30 pg. Măsurarea greutății nucleilor fixați cu vapori de osmiu și apoi cu etanol și tratați 2 ore cu DN-ază 1‰ în tampon pH = 7 la 56°C a arătat o pierdere de 15% din greutatea uscată totală (măsurată în prealabil), care corespunde, în medie, la 2,2 pg ADN per nucleu de fibroblast de pui de găină și 6—6,7 pg la șobolan.

Sub influența hormonilor se poate provoca mărirea volumului nucleilor și a cantității de proteine din ei, dar ADN rămîne constant. După R. și C. Vandrely histonele sînt sintetizate în nucleu precedînd duplicarea ADN și sinteza altor proteine nucleare. La plante sinteza proteinelor durează toată interfaza, iar autohistoradiografiile făcute la leucocite umane cultivate „in vitro" arată că proteinele cromozomale se sintetizează și ele în toată interfaza. Înainte de sinteza ADN, în fibroblaști și în celule tumorale se acumulează ARN-polimeraza. A. Zetterbetg și D. Killander au arătat, citochimic, că în a doua jumătate a interfazei are loc dublarea cantității de proteine nucleare și de ARN nuclear. Masa totală a celulei se dublează și ea înaintea mitozei. Nucleolul la începutul interfazei are 3 pg greutate uscată, dublîndu-se în timpul pregătirii mitozei.

Histonele. Sînt proteine care conțin mai mult de 22% aminoacizi bazici. Prezintă o sarcină pozitivă la pH = 8 și dincolo de acesta. Nu conțin decît foarte puțină cisteină și cistină și nu au triptofan. Grupările N-terminale sînt alanina, prolina, acetil ; grupările C-terminale sînt lizina, glicina și alanina. Nu au secvențe tipice de aminoacizi și formează complexe cu ADN-ul eucariotelor. Au o G.M. de 20 000.

Histonele se grupează în clase cu mai multe subdiviziuni fiecare (12—20), astfel :

— *clasa* f_1 (I, *KAP*) bogată în alanină și lizină, cu o proporție $\frac{\text{lys}}{\text{arg}} = 20$;

— *clasa* f_2b (II b_2, *KAS*) bogată în serină și lizină, cu $\frac{\text{lys}}{\text{arg}} = 2{,}5$;

[1] pg = picogram (10^{-12} g).

— *clasa* f_2a_2 (II b_1, *LAK*) bogată în leucină, cu $\frac{\text{lys}}{\text{arg}} = 1$;

— *clasa* f_3 (III, *ARE*) bogată în glutamină și arginină, cu $\frac{\text{lys}}{\text{arg}} = 0{,}72$;

— *clasa* f_2 a_1 (IV, *GRK*) bogată în glicină și arginină, cu $\frac{\text{lys}}{\text{arg}} = 0{,}79$.

Aceste proteine au apărut odată toate, cu prima celulă eucariotă și cu diferențierile acesteia. Ele protejează ADN față de denaturările termice iar dinoflagelatele, care au puține proteine bazice, posedă și un ADN mai puțin stabil față de acțiunea căldurii. Există circa 1 200 copii pentru fiecare genă de histone, care sînt grupate „în tandem" de gene invariante, separate de secvențe variabile. Este vorba deci de un ADN repetitiv și această situație reduce enorm de mult posibilitatea apariției mutațiilor letale.

După gradul lor de constanță relativă (a secvențelor de aminoacizi) în cursul evoluției, histonele s-au împărțit în trei categorii : *1*) fracțiile f_3 și f_{2a_1}, cu un procent extrem de mic de mutații ; *2*) f_{2b} și f_{2a_2}, cu un procent intermediar și *3*) f_1, cu un procent relativ ridicat. Ori fracția f_1 are în extremitatea C-terminală 40 aminoacizi bazici în plus față de aminoacizii cu caracter acid, în timp ce fracțiile celelalte au numai 3—5.

Proteinele acide. Sînt heterogene și în multe cazuri fac parte și din cromatina membranei nucleare. T. Pederson (1974) a izolat asemenea proteine care sînt legate de ARN-ul heterogen nuclear. Ele au un *p*H izoelectric de 4,9—8,3 și sînt organospecifice.

Proteinele acide ale cromatinei sînt reprezentate prin : *a*) proteine care se unesc cu ARN-*s* nuclear pe care le însoțesc în transformările lor, pînă ajung în citoplasmă ; *b*) două feluri de proteine care se fixează pe f_1 sau la polilizină ; *c*) proteine migrate din nucleu în citoplasmă.

Proteinele acide încorporează activ precursorii marcați „in vivo" și sînt dispersate de-a lungul genomului. Cantitatea lor în nuclei este mică, ajungînd abia la 5—10% din cantitatea histonelor.

c-ARN (sau *acidul ribonucleic cromozomal*). A fost descoperit de R. Huang (1965) și este bogat în acid dihidrouridilic, fiind un lanț de 40—50 nucleotide legat neionic de un peptid. *c*-ARN prezintă un raport $\frac{\text{A} + \text{G}}{\text{U} + \text{C} + \text{UdiH}} = 1$.

Acest tip de acid ribonucleic hibridează cu 4—5% din ADN-ul genomului și anume cu secvențele sale repetitive. Rolul său este să reasocieze la momentul oportun elementele disociate ale cromatinei. Circa 50% din el este reprezentat de ARN 35S și este considerat a fi un factor al inițierii proteosintezei citoplasmatice atunci cînd trece în citoplasmă. D. Bogdanovsky (1973) și L. Goldstein (1965) surprind, în acest sens, o trecere reversibilă a unor proteine acide — un ARN asociat cu un polipeptid — în citoplasmă. Este bine stabilit că *c*-ARN se deosebește de *t*-ARN 4S și *r*-ARN 5S, pentru că hibridează în mare cantitate, și de *m*-ARN prin faptul că se marchează „in vitro" încet.

J. Frenster a elaborat o schemă (fig. 104) a transcripției genice selective din nucleul mamiferelor în care *c*-ARN joacă un rol derepresor.

Scanned with OKEN Scanner

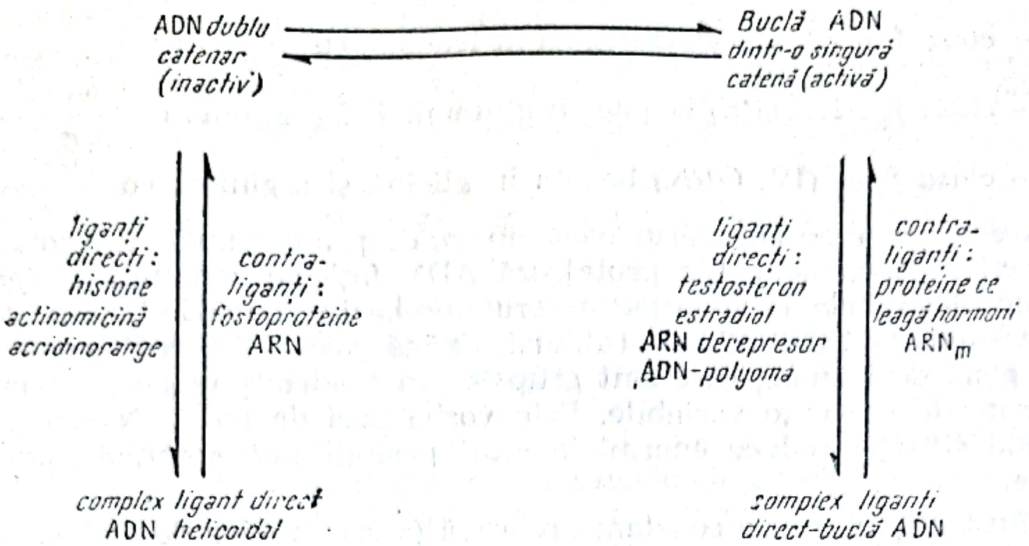

ADN dublu catenar (inactiv)
Buclă ADN dintr-o singură catenă (activă)
liganți direcți: histone actinomicină acridinorange
contra-liganți: fosfoproteine ARN
liganți direcți: testosteron estradiol ARN derepresor ADN-polyoma
contra-liganți: proteine ce leagă hormoni ARNm
complex ligant direct ADN helicoidal
complex liganți direct-buclă ADN

Fig. 104. Stabilizarea stadiilor de transcripție a ADN prin controlul liganților.

Liganții direcți pot să schimbe echilibrul dintre ADN helicoidal dublu catenar inactiv și ADN activ din bucla cu o singură catenă, datorită legăturilor preferențiale față de una din aceste două configurații ale ADN. ***Contraliganții*** pot să inverseze efectele liganților direcți, prin formarea unor complexe competitive cu liganții direcți. Unde nu există contraliganți naturali pentru anumiți liganți direcți (actinomicină, metilcolantren, ADN-polyoma), efectele liganților direcți sînt mai puțin reversibile (după F r e n s t e r).

Experimental, a realizat un preparat de cromatină nativă la care, adăugînd c-ARN, constată o creștere a încorporării UTP-2-^{14}C în noul ARN sintetizat.

După J. F r e n s t e r polianionii nucleari pot forma complexe electrostatice cu moleculele represoare ale histonelor policationice. Astfel, într-un loc pe cromozom ia naștere un *complex derepresor-histone*. În modul acesta se deplasează histonele de pe grupările fosfatice ale dublului helix de ADN, însă întreaga cantitate de histone rămîne neschimbată în complex. Asemenea derepresori capabili să deplaseze histonele din complexul lor cu ADN sînt : ARN nuclear și marcabil rapid cu radioizotopi, fosfoproteine, fosfolipide și proteine reziduale nehistonice. Asemenea substanțe se pot extrage cu tampoane neutre din heterocromatina izolată după care catenele dublului helix se separă în diferite locuri datorită respingerii dintre grupările fosfatice adiacente de la exteriorul helixului de ADN, care mai înainte erau neutralizate de histonele policationice. ADN din bucla catenei separată hibridează cu ADN nuclear datorită complementarității bazelor. Ori această hidridare „alege“ tocmai locii anumitor gene, deoarece bucla rămasă liberă a ADN va transcrie un anumit *m*-ARN.

O serie de liganți ca histone-polilizină, actinomicină-D, acridin -orange, quianacrină, care se leagă de dubla catenă ADN, inhibă biosinteza ARN, în timp ce alții (testosteron, estradiol, metilcolantren, ARN-polimerază, ARN derepresor), care se leagă de o singură catenă, stimulează sinteza ARN. Contraliganții (fig. 105) sînt capabili să inverseze efectul diferiților

liganți direcți prin competiția pe care o au în formarea complexelor cu aceștia. Dacă liganții direcți (actinomicina, ADN-polyoma, metilcolantrenul) nu au contraliganți naturali, atunci acțiunea lor este aproape ireversibilă.

Se mai remarcă faptul că molecula de ARN din celulele mamiferelor este *dublu-catenară*. De exemplu, moleculele ARNs din nucleu au o compoziție în baze care este mult mai apropiată de ADN decît cele de *m*-ARN, așa că în cadrul unei hibridări cu ADN acidul ribonucleic solubil nuclear

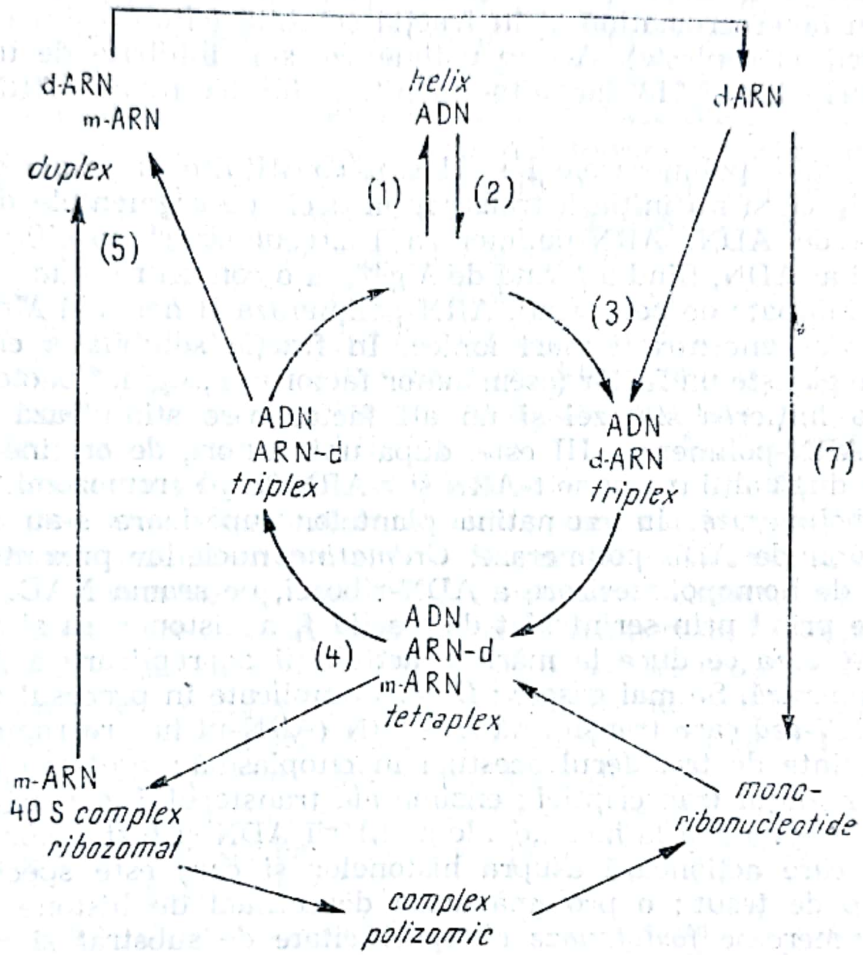


Fig. 105. Interacțiunile acizilor nucleici în timpul dozării compensatoare genice de la mamifere.

m-ARN = ARN mesager; *d* — ARN = ARN derepresor; *1* — represia matricei prin stabilizarea helixului de ADN față de separarea catenelor; *2* — labilizarea matricei prin formarea întîmplătoare a buclelor de ADN monocatenare; *3* — selecția matricei prin formarea triplexului între matricea de ADN labil și ARN derepresor, specific pentru un anumit locus genic; *4* — transcripția matricei de sinteză a ARN pe o catenă liberă de ADN a triplexului; *5* — inactivarea prin scoaterea ARN derepresor de pe ADN, urmată de formarea unor complexe ARN-ARN competitive, mai stabile, între *m*-ARN și *d*-ARN, specifice fiecare pentru un anumit locus genic; *6* — liberarea selectorului prin scoaterea *m*-ARN din complexele ARN-ARN; *7* — degradarea selectorului prin hidroliza moleculelor de ARN (după **Frenster**).

Scanned with OKEN Scanner

(ARNs) intră în competiție și se obțin hibrizi direcți ARN-ARN. Semnificația unor astfel de complexe ARN-ARN (*m*-ARN-*D*-ARN), într-un singur locus genic, este că se oferă un mecanism molecular în explicarea cazului heterocromatizării printr-un exces de cromozomi X.

Enzimele nucleare. Fac parte din subfracția proteinelor nehistonice și este greu de stabilit dacă fac parte sau nu din structurile cromozomice.

ARN-polimeraze. Sînt de mai multe feluri : *ARN-polimeraza I,* localizată în nucleoli și în heterocromatina condensată ; *ARN-polimeraza II,* care se găsește în nucleoplasmă și în eucromatina difuză ; *ARN-polimeraza III* în heterocromatină și în fracția solubilă (citosol) din citoplasmă (mitocondrii, cloroplaste). Aceste polimeraze sînt inhibate de un derivat al rifampicinei, AF/013 iar alfa-amanitina inhibă numai ARN-polimeraza II.

La eucariote polimerazele I și II sînt constituite din cinci subunități (α, α_1, β, β_1, ω) și nu inițiază transcripția decît pe segmentele denaturate sau tăiate de ADN. ARN-polimeraza I „recunoaște" specific cistronii ribozomali ai ADN, fiind activată de Mg^{2+}, la o concentrație mare de aminoacizi și inhibată de polifosfați. ARN-polimeraza II necesită Mn^{2+} și este stimulată de concentrații mari ionice. În fracția solubilă a citoplasmei (citosol) se găsește un factor (asemănător factorului „sigma" bacterian) care stimulează inițierea sintezei și un alt factor care stimulează alungirea lanțului. ARN-polimeraza III este, după unii autori, de origine mitocondrială, iar după alții transcrie *t*-ARN și *r*-ARN 3S pe cromozomi.

ADN-polimeraze. În cromatina plantelor superioare s-au găsit mai multe fracții de ADN-polimeraze. *Cromatina* nucleilor prezintă o mare activitate de homopolimerizare a ADN-ribozei, pe seama NAD. Polimerii formați se prind prin serinfosfat de fracția f_1 a histonei, ca și de proteinele acide, ceea ce duce la mărirea activității de replicare a ADN prin ADN-polimerază. Se mai găsesc : *DN-aze* implicate în procesul de sinteză a ADN ; *RN-ază* care transformă *Hn*-ARN (ARN-ul heterocromatinei nucleare) înainte de transferul acestuia în citoplasmă ; *proteaza histonelor* cu rol în reglajul transcripției ; enzime ale transferului grupării metil de la adenozinmetionină la histone ale metilării ADN și histonelor : o *transacetilază,* care acționează asupra histonelor și care este specifică unui anume tip de țesut ; o proteină acidă deacetilată de histone *(fosfoproteină)* ; numeroase *fosfokinaze* cu specificitate de substrat și cu *c*-AMP cofactor. După 10—16 ore de la injecții cu izoproterenol se constată o stimulare a activității fosfokinazei, înainte de stimularea sintezei *r*-ARN și care este paralelă cu fosforilarea proteinelor acide nucleare. Se remarcă în mod deosebit prezența *NAD-fosforilazei* ce produce NAD din NMN și ATP, exclusiv în nucleu.

8.6. BIOLOGIA MOLECULARĂ A CONSTITUENȚILOR CROMATINEI

Cele cinci fracții ale histonelor se găsesc în raporturi de $0{,}5f_1 : 1f_2a_1 : 1f_2a_2 : 1f_2b : 1f_3$, iar ansamblul are un raport histone — ADN de 1 : 1.

În concepția lui R. Kornberg (1974) cromatina este formată din *subunități* dispuse regulat și constituite din fragmente înrulate de ADN,

lungi de 200 perechi de nucleotide, la care se asociază stoekiometric histonele. Fracţiile $[(f_{2a1})_2 + (f_3)_2]$ reprezintă „nodul" unităţii, el fiind cel mai bine păstrat în decursul evoluţiei. Ele sînt sub formă globulară şi greu de disociat prin forţe ionice. Complexul 2 $[(f_{2a2})\ (f_{2b})]$ se aliniază de-a lungul dublului helix de ADN, iar f_1 acoperă ansamblul care are acum aspectul unui şirag de mărgele. Cercetările lui M. Noll (1974), C. Woodcock (1974), A. Olins (1974), B. Honda (1974), J. d'Anna (1974), H. Martison (1975), J. Hyde (1975), R. Seale (1975), K. van Holde (1974) etc. n-au făcut decît să confirme existenţa subunităţilor în cromatină. Fracţiile f_{2a1} şi f_3, pe de o parte şi f_{2a2} şi f_{2b}, pe de altă parte formează dimeri stabili care se orientează doi cîte doi după polaritatea celor două fibre de ADN. Asemenea complexe sînt menţinute sub formă tetrameră prin interacţiuni slabe între f_{2a1} — f_{2a2} şi f_3 — f_{2b} şi prin interacţiuni puternice între f_{2a1} — f_{2b} şi f_3 — f_{2a2}. Atunci cînd se replică ADN, catena formată se acoperă în mod discontinuu de oligomere ale histonelor.

K. van Holde (1974) a propus un model molecular al cromatinei după care histonele, minus f_1, se fixează pe ADN prin extremitatea N şi interacţionează între ele prin C-terminal. Interacţiunile hidrofobe ale α-helixului histonelor provoacă formarea unui nucleu proteic în jurul căruia se înfăşoară ADN. Cu alte cuvinte, ADN se înfăşoară în superhelix acolo unde histonele, fiind legate între ele prin secvenţe hidrofobe, formează un nucleu proteic. Fracţia f_1 are rolul de legătură între fibrele de cromatină. În orice caz, f_1 se fixează pe ADN la exteriorul particulelor lui Kornberg, modulînd condensarea fibrelor prin legături inter- şi intrafibrilare. Aşa se explică deci marea accesibilitate la ADN-ul cromatinei a DN-azei, deoarece ADN stă pe o matrice proteică În schimb, cînd cantitatea de α-helix a histonelor este mare, accesibilitatea la ADN scade. DN-aza I digeră ADN în secvenţe scurte, multiple şi regulate, de 10 perechi de baze. Într-adevăr, numai prin digestia nucleilor printr-o endonuclează sau nuclează de *Micrococcus* este posibilă obţinerea particulelor de 200 perechi de baze. Digestia prin DN-ază I a cromatinei nu realizează aceste particule.

D. Oliver şi R. Chalkley (1975) consideră că histonele sînt aşezate asimetric pe ADN, digestia fiind accesibilă în scobitura mare a dublului helix. Digerarea rapidă a acestor secvenţe ar elibera histonele care se redistribuie în restul helixului, protejîndu-l de hidroliză.

8.7. REPARAŢIA CROMOZOMILOR

Ori care ar fi structura intimă a cromozomilor, nu se poate concepe să nu existe mecanisme deosebit de precise de menţinere a integrităţii materialului genetic. S-a calculat că o genă bacteriană se poate replica de 100 de milioane de ori înainte de a avea 50% posibilitatea de a se altera. Există deci o mare stabilitate a materialului genetic care, în condiţii naturale, cînd radiaţiile ultraviolete pot produce alteraţii ale codului genetic, acesta poate să-şi „corecteze" erorile.

Scanned with OKEN Scanner

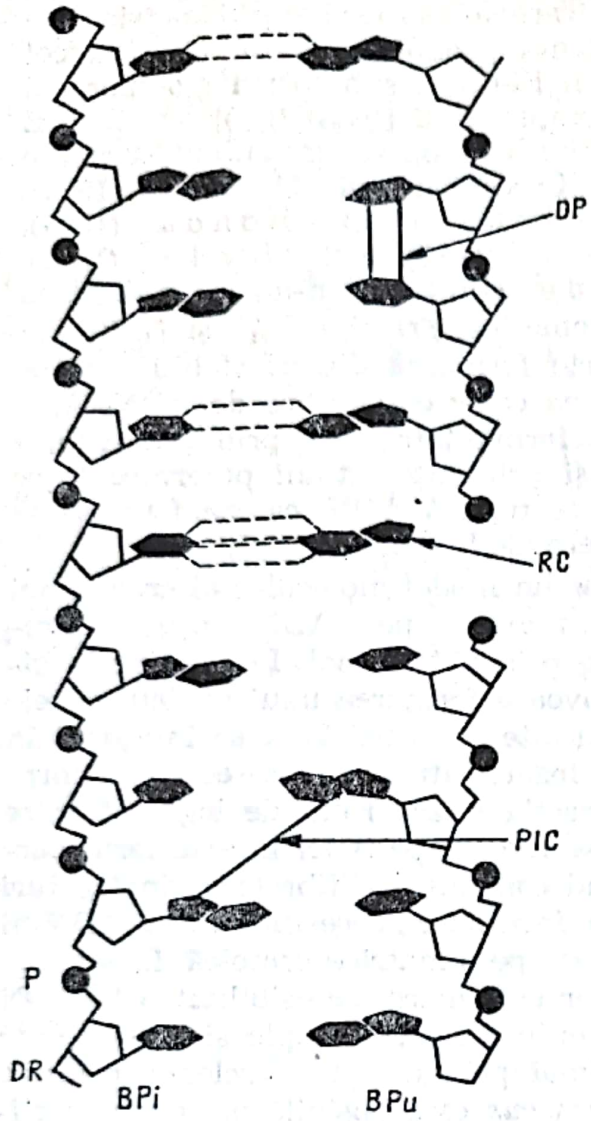


Fig. 106. Influența radiațiilor X asupra ADN. Radiațiile X au trei acțiuni asupra dublului helix de ADN : *RC* — fiecare lanț poate fi rupt în parte de razele X care distrug dezoxiriboza, unind bazele între ele. Reparația necesită înlocuirea cel puțin a unei subunități ; *DP* — prin absorbția razelor ultraviolete se formează dimeri pirimidinici, de exemplu între două timine vecine, destul de stabili, care pot fi separați datorită unei enzime de restaurație fotosensibilă ; *PIC* — legăturile de „pontaj" care stabilesc cele două catene pot fi reparate prin excizia regiunilor alterate și sinteza reparatoare a fiecărei secvențe eliminată (după J. Cleaver).

Defecțiunile produse incidental în ADN sînt „reparate" ori de cîte ori se produc, în așa fel că stabilitatea genetică este asigurată. Totuși, corecția nu este perfectă, deoarece nu se repară întotdeauna toate accidentele mutagenetice. Și aceasta este se pare o șansă care oferă posibilitatea păstrării unor mutații genice. Poate că factori ai evoluției trebuie căutați și printre mutațiile genice care privesc mecanismele de reparație cromozomală, pentru că este îndeobște cunoscut că mutațiile fortuite apărute într-o populație sînt eliminate în cursul perpetuării ei.

Celulele noi sînt supuse în mod natural la două tipuri esențiale de radiații — luminoase și ionizante —, absorbția acestor radiații putînd provoca trei tipuri de leziuni : *a*) astfel, se poate rupe pur și simplu o parte dintr-un lanț al ADN, iar în momentul diviziunii celulare replicarea lanțului se oprește la nivelul rupturii ; *b*) în al doilea caz, datorită iradierii, se rup legăturile de H dintre bazele complementare și în locul lor apar legături stabile. Cele două lanțuri ale dublului helix sînt astfel „prinse în copci", așa că nu se mai pot replica ; *c*) al treilea caz este atunci cînd două baze vecine de pe același lanț de ADN se leagă între ele formînd dimeri (fig. 106). Ori prezența unui dimer împiedică și ea replicarea. Acest blocaj s-a comparat cu defectarea unui fermoar prin prinderea a doi dinți într-un interval.

Reparația stricăciunii „in situ". Un exemplu al acestui fel de reparații îl constituie fotoreactivarea en-

Scanned with OKEN Scanner

zimatică. În 1949 A. Kelmer descoperă că o cultură bacteriană iradiată poate supraviețui mult timp, dacă este după aceea expusă la o lumină albastră puternică. Independent de aceste cercetări, tot în 1949, R. Dulbeco observă același fenomen la celulele infectate de viruși. Mecanismul molecular este explicat de către C. Rupert (1964) în felul următor: salvarea vine de la o enzimă, care „recunoaște" efectiv dimerii născuți sub acțiunea razelor UV. Enzima se prinde pe dimeri în absența luminii și rămîne astfel legată de ADN-ul lezat pînă la acțiunea luminii. Sub influența luminii dimerii sînt separați pe loc și enzima se detașează de complex. Lumina vizibilă dă energia necesară sciziunii dimerului. Fotoreactivarea enzimatică este un fenomen larg răspîndit la tot felul de celule, cu excepția celor de la mamifere (fig. 107).

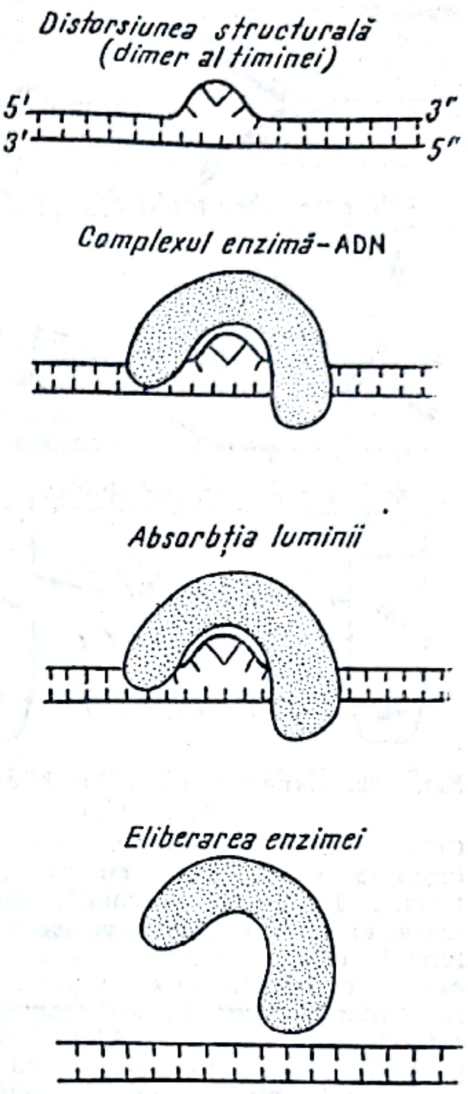


Fig. 107. Reprezentarea schematică a etapelor fotoreactivării enzimatice a dimerilor pirimidinici (după P. Hanawalt).

Încă din anul 1936 A. Hollaender și W. Claus au descoperit că se poate obține supraviețuirea multă vreme a unor spori de ciuperci iradiați cu UV, dacă sînt menținuți într-un mediu tamponat înainte de a fi însămînțați pe geloză. Deci există și o reparație în condiții de întuneric

Reparația prin excizie. A fost descoperită de M. Meselson și F. Stahl (1958) pe cînd verificau dacă modul de replicare al ADN „in vivo" este semiconsecutiv. (Replicarea semiconsecutivă realizează pentru fiecare moleculă-fiică de ADN un lanț patern și unul nou format).

Metoda constă în a se încorpora un marcaj greu bromo-5-uracil în ADN-ul nou sintetizat. Raza forțelor van der Waals a grupării metil a timinei și aceea a bromului din brom-5-uracil sînt asemănătoare, așa că ADN se modifică încorporînd acest analog în locul timinei. Fragmentele izolate de ADN, care conțin cantități variabile de brom-5-uracil, sînt separate într-un gradient de clorură de cesiu. În cadrul replicării semiconservative prin marcaj de scurtă durată cu un analog greu se obțin cîteva fragmente de ADN cu unul din lanțuri marcat cu brom. Aseme-

Scanned with OKEN Scanner

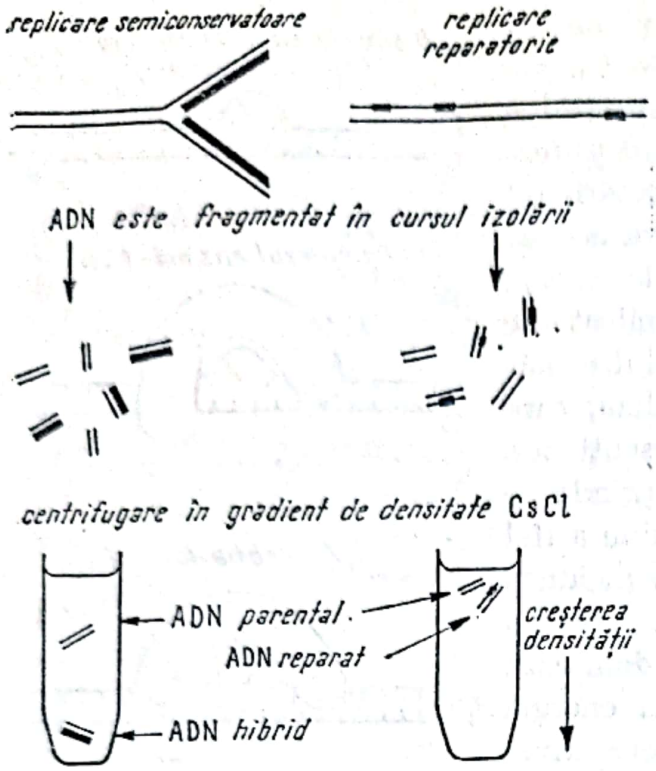


Fig. 108. Experienţa lui M. Meselson şi F. Stahl.

Celulele sînt crescute într-un mediu cu bromo-5-uracil marcat cu tritiu, în loc de timină. Replicarea normală, semiconservatoare, are loc simultan şi secvenţial de-a lungul celor două lanţuri complementare parentale. *Liniile groase* reprezintă lanţurile fiice marcate cu bromo-5-uracil, iar *liniile subţiri* cele cu amină. ADN izolat este introdus într-o soluţie concentrată de CsCl şi centrifugată mult timp, pînă cînd un gradient de densitate se echilibrează cu soluţia salină. Fragmentele de ADN se aşază în acest gradient după densitatea lor : diferitele benzi de densităţi sînt determinate de porţiuni din tuburile de centrifugare. Benzile cu bromo-5-uracil sînt determinate datorită marcajului cu tritiu. În replicarea reparatoare, fragmentele de ADN parentale nu au decît puţin bromo-5-uracil în zonele superioare, iar mai spre fundul tubului lipsesc (după Meselson).

nea lanţuri sedimentează la un nivel de densitate „intermediar", între acela unde se depune ADN natural şi cel cu întregul dublu helix marcat. În replicarea reparatoare o mică parte dintr-un lanţ de ADN este înlocuită cu un marcaj greu cu brom-5-uracil, astfel că fragmentele de ADN se depun la un nivel mai superior în tubul de centrifugă decît precedentele (fig. 108).

J. E. Cleaver a arătat prin această metodă că fibroblaştii pielii umane normale pot, în urma unor iradieri cu UV, să-şi repare ADN. Din contră, fibroblaştii bolnavilor de „xeroderma pigmentosum", nu prezintă nici o replicare reparatoare. Victimele acestui deficit genetic sînt foarte sensibile la radiaţiile solare care produc carcinoame şi melanoame pe părţile expuse ale corpului lor, aşa că absenţa procesului reparator al ADN este responsabilă de apariţia cancerului pielii care apare în urma expunerii la soare ; este un argument după care boala canceroasă este genetică şi replicarea reparatoare este o formă de apărare celulară la transformările oncologice.

Alterarea structurală este reparată de o endonuclează specifică leziunii care „recunoaşte" dimerii pirimidinici pe care-i separă de lanţul de ADN. Apoi, o a doua enzimă, ADN-polimeraza I produce „in vivo" repararea fragmentelor scurte ale ADN-ului afectat şi o altă AND-polimerază înlocuieşte fragmentele lungi. Aceste polimeraze au rolul şi de 5'-exonucleaze, eliminînd în mod specific dimerii timinei sau secvenţele de baze neasortate ale ADN, sub formă de oligonucleotide. Paralel cu

Scanned with OKEN Scanner

aceasta se adaugă nucleotide la extremitatea 3'-OH a inciziunii inițiale. În sfîrșit, a treia enzimă este o polinucleotid-ligază, care consolidează lanțul reparat formînd ultima legătură fosfo-diester-8'-5' (fig. 109).

Repararea prin recombinare după replicare. Aceasta s-a descoperit la o mutantă *uvr*-A de la *Escherichia coli*, care nu poate să repare ADN prin excizie, putînd totuși să trăiască cu o mare cantitate de dimeri pirimidinici. Este clar că are loc un alt mecanism de reparație, după replicarea normală a ADN deja alterat, așa că se reconstruiesc secvențele bazelor corect, cu toate că bazele „alterate" nu se elimină din ADN-ul original.

W. Rupp și P. Howard Flanders (fig. 110) au propus ca explicație recombinarea genetică care are loc după replicare. Lanțurile-fiice nou sintetizate se prezintă ca fragmente mai scurte decît acelea ale celulelor normale; aceasta, pentru că rămîn goluri în lanțurile-fiice atunci cînd replicarea traversează o zonă defectă, cu dimeri pirimidinici. Aceste goluri sînt umplute cu secvențele corecte ale lanțului bicatenar parental de origină, așa încît lanțurile-fiice apar întregi. Lanțurile parentale se repară datorită ADN-polimerazei și ligazei, iar la replicarea următoare dimerii vor produce din nou o ruptură care va fi iar reparată, astfel că porțiunile de ADN cu dimeri se vor „dilua" progresiv, fără ca genele respective să se desprindă de lanț.

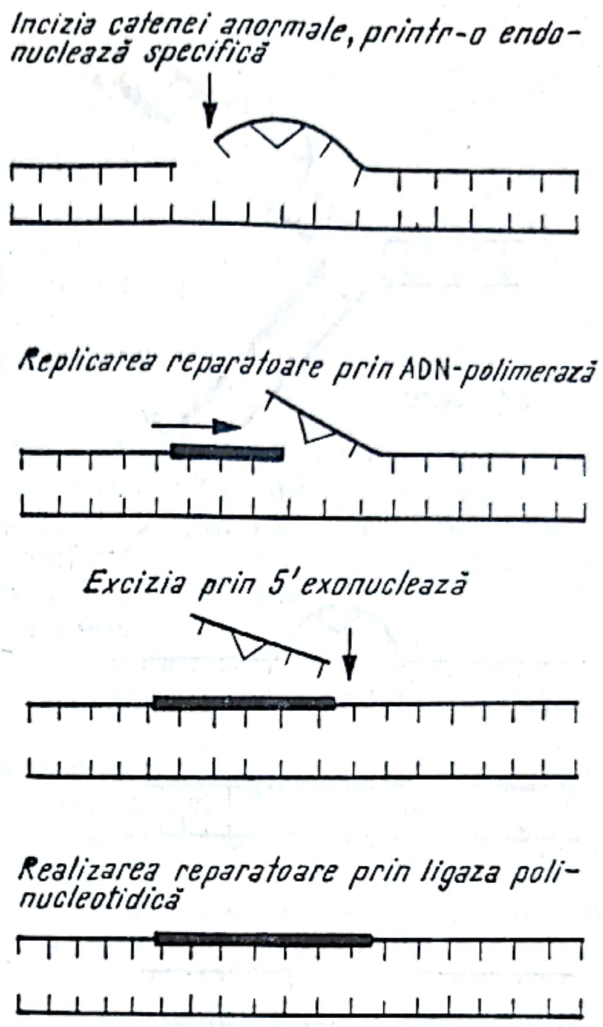

Incizia catenei anormale, printr-o endonuclează specifică
Replicarea reparatoare prin ADN-polimerază
Excizia prin 5'exonuclează
Realizarea reparatoare prin ligaza polinucleotidică

Fig. 109. Etapele care se succed în decursul reparației prin excizie.
Mica porțiune reparată este reprezentată prin banda neagră. Săgețile verticale indică localizarea inciziei nucleazice efectuate în catena stricată, iar săgeata orizontală arată direcția replicării reparatoare, începută de la capătul 3'-OH al lanțului ADN (după P. Hanawalt).

Se cuvine de prezentat o remarcă făcută de D. Brutlag și A. Kornberg, după care ADN-polimeraza I de la *Escherichia coli* funcționează nu numai ca o enzimă de sinteză ci și ca un „control de calitate". Această funcție se datorește activității sale exonucleazice 3'—5'.

Scanned with OKEN Scanner

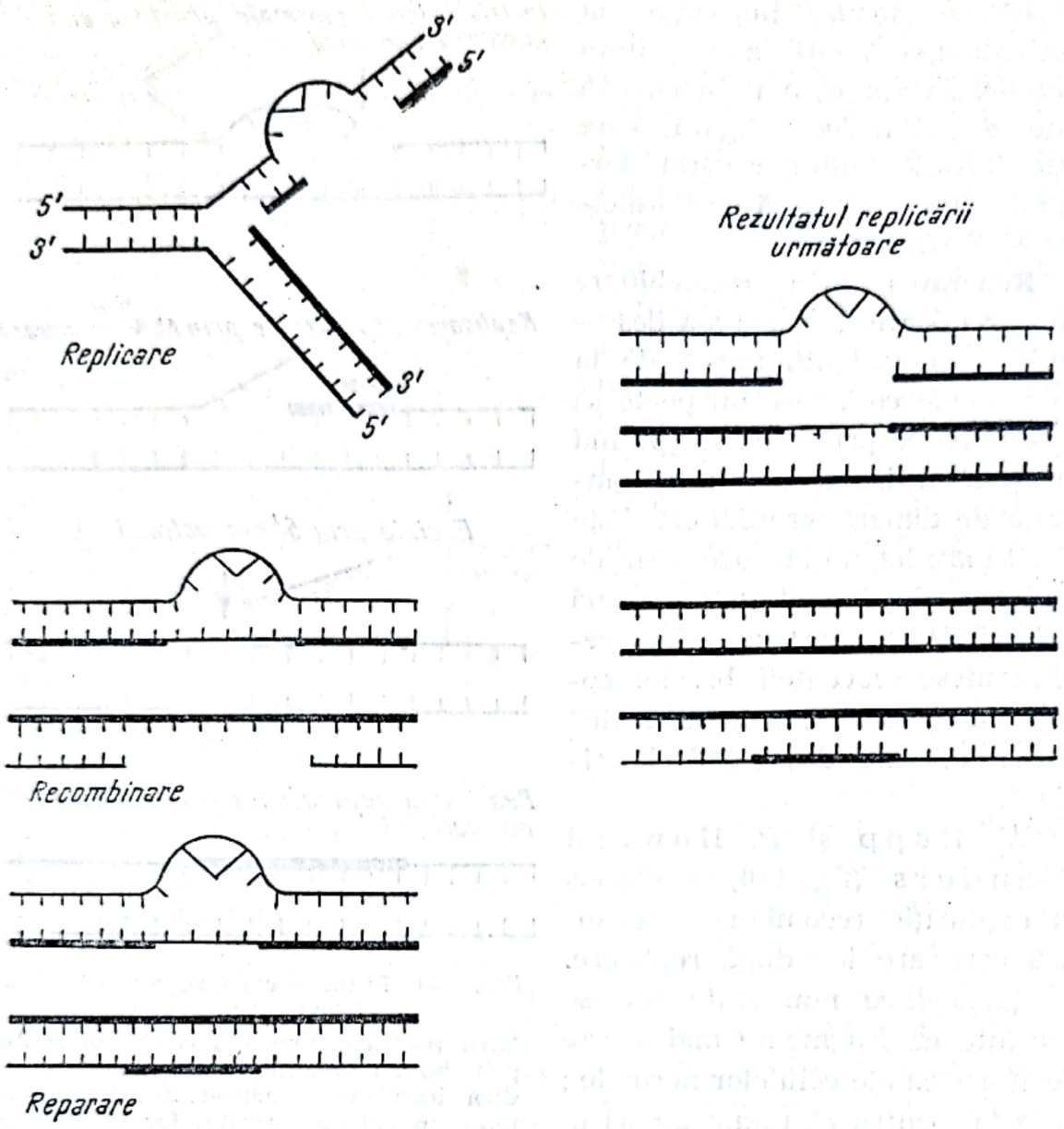


Fig. 110. Modelul reparației prin recombinare după replicare.
Aceasta se produce în mod normal dar cu „spărturi" în regiunile din fața zonelor deformate ale lanțului parental. După replicare, celălalt lanț parental formează o secvență cu nucleotidele care lipsesc și care vor umple spărturile. O ADN-polimerază umple spărturile care rămîn în fața lanțurilor intacte fie parentale, fie filiale. Unele dintre dublele helixuri care servesc la replicarea normală următoare nu mai sînt vătămate. Lanțurile ADN vătămate sînt cu timpul „diluate", dar zonele vătămate nu se desprind niciodată de lanțurile de ADN (după P. H a n a w a l t).

prin care se separă de extremitatea 3'—OH a lanțului de ADN în formare toate nucleotidele care nu se „potrivesc". „In vivo", această enzimă direcționează corect formarea lanțului de ADN, „corijînd" erorile de cuplaj ale bazelor, care pot apare în cursul replicării normale.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 9

MITOZA

Este fenomenul prin care se împart toate elementele subcelulare şi se repartizează în cele două celule-fiice. Prin ea se asigură continuitatea ADN de-a lungul generaţiilor de celule în timpul vieţii şi în reproducerea indivizilor. Termenul îşi are semnificaţia de la faptul că, în timpul diviziunii, cromozomii apar bine vizibili colorîndu-se uşor cu hematoxilină, verde de metil, orceină, safranină etc.

Mitoza cuprinde patru faze care se succed :

1) *profaza,* cu modificări ale cromozomilor, ale centriolului şi apariţia fusului acromatic ;

2) *metafaza,* cînd se dezorganizează membrana nucleară, iar cromozomii se aşază la ecuatorul fusului formînd „placa cromozomală" ;

3) *anafaza,* în care are loc ascensiunea cromozomilor spre cei doi poli ai fusului ;

4) *telofaza,* cu reconstrucţia nucleilor-fii şi împărţirea citoplasmei, a tuturor constituenţilor ei, între cele două celule-fiice (fig. 111).

9.1. FAZELE MITOZEI

9.1.1. PROFAZA

Observat pe viu, în profază, nucleul prezintă din ce în ce mai multe granule de cromatină care sînt mult mai mici decît în nucleul interfazic. Granulele apoi se contopesc mai mult sau mai puţin. Lîngă membrana nucleară se individualizează progresiv cromozomii în forma lor bine determinată. La început ei sînt subţiri şi coloraţi palid, dar cu timpul devin bine conturaţi. Se admite de mulţi autori că în interfază cromozomii sînt destul de extinşi, fiind funcţionali atît în sensul replicării, cît şi în acela al transcripţiei. În timpul mitozei devin vizibili la microscopul fotonic, tocmai datorită spiralizărilor care-i îngroaşă şi-i scurtează. Astfel, în profaza timpurie, apare o spiralizare *minoră,* iar la sfîrşitul profazei încă una *somatică,* spiralizare care conferă forma caracteristică a cromozomilor metafazici. Se admite în general că, în timpul mitozei şi al meiozei, spiralizarea aceasta se caracterizează prin două tipuri de spire : *paranemice,* în care subunităţile care se înfăşoară sînt libere şi separabile şi *plectonemice,* în care subunităţile se răsucesc una în jurul celeilalte.

În privinţa modalităţilor prin care se realizează spiralizarea, s-a considerat a fi trei tipuri : *a*) unul *relaţional,* de răsucire în chip de funie, aşa fel încît subunităţile în cauză nu mai pot fi separate decît după o despi-

Scanned with OKEN Scanner

9.1.2. METAFAZA

Cromozomii metafazici sînt formaţi din ADN, ARN şi proteine, cum se poate uşor constata *histochimic* (reacţia Feulgen pentru ADN ; verde de metil-pironină precedată de „digestia" cu RN-ază pentru ARN ; verde direct FCF la *p*H = 8,1 pentru histone sau la *p*H = 3—4 pentru proteine acide după eliminarea histonelor şi acizilor nucleici). Analiza cromozomilor izolaţi din celule prin *metoda sedimentării în gradient de zaharoză* 2,2 M a arătat că ADN-ul este în proporţie de 16,2%, ARN 10,9%, proteinele 72,9%. Dintre proteine, 56,8% sînt histone (solubile în 0,2 M HCl) şi 29,6% sînt proteine nehistonice (solubile în 0,2 H_2SO_4). Legarea constantă de Mg^{++} a cromozomilor este de $1{,}06 \times 10^{5}$ M/l^{-1} iar numărul „sitelor" de legătură de cromozomi este de aproximativ $1{,}6 \times 10^{-5}$ mM/mg de cromozomi. S-a calculat că pentru fiecare legătură de magneziu se eliberează 20 de ioni de hidrogen.

O serie de lucrări de electronmicroscopie au evidenţiat o împachetare şi compactizare a filamentelor de 230 Å Ø, care dau configuraţia cromozomilor metafazici. Aceste filamente conţin un dublu helix de ADN în interior, învelit de ribonucleohistone. Cromozomii metafazici sînt stabili în soluţii acide (*p*H<5,5) în prezenţa sau absenţa ionilor bivalenţi, se dizolvă în soluţii bazice (*p*H>7,5) în absenţa respectivilor ioni, sau sînt stabili în prezenţa unei concentraţii de 10^{-3}M de ioni bivalenţi. Pentru H. R i s şi o serie de alţi cercetători, fibrele de 200—250 Å Ø etalate pe apă formează o reţea strînsă care, tratată 10 s cu o soluţie tamponată de 5 mM citrat de sodiu, se dedublează în fibrile de 100 Å Ø, paralele şi de grosimi neuniforme. Tratarea cu pronază, care digeră învelişul proteic al filamentelor, evidenţiază dublul helix de 25 Å Ø.

Studiile cromatinei în raze X au postulat ideea că fibrele de nucleoproteine primare au un diametru de 35 Å şi ele se înfăşoară realizînd un helix cu un diametru de 110 Å. Condensarea fibrelor de cromatină în cromozomii metafazici se face cu participarea histonelor bogate în lizină. În orice caz, extragerea histonelor din materialul cromozomal produce dispersarea filamentelor de nucleohistone, iar adăugarea de histone bogate în lizină le împachetează. Histonele bogate în arginină nu au nici un efect asupra filamentelor de nucleohistone.

V. S o r s a (1973), tratînd cromozomi anteprofazici cu o soluţie alcalină de uree (1 M NaOH şi 10 M uree) care dizolvă proteinele cromozomale, a observat la microscopul electronic foante bine individualizate cromatidele. Acestea sînt formate din două feluri de fibre : unele groase, de 100—150 Å, neîntinse, cu bucle, inele şi structuri supraîncolăcite şi altele subţiri, de 30 Å, întinse şi uneori paralele cu primele. Cele două feluri de fibrile formează spaţiile intercromatice, iar buclele reprezintă tocmai cromomerele (fig. 112).

Cromomerele, care se întîlnesc în profaza meitoică a oocitelor şi spermatocitelor, sînt reprezentate prin „bucle" care se desfăşoară în afară de axul cromozomului. Acelaşi aspect „în perie de lampă" îl au şi cromozomii politenici trataţi cu o soluţie de uree alcalină.

Observaţiile electronmicroscopice ale lui S o r s a îl duc la concluzia că axul cromatidei este format din două duble helixuri de ADN dintre

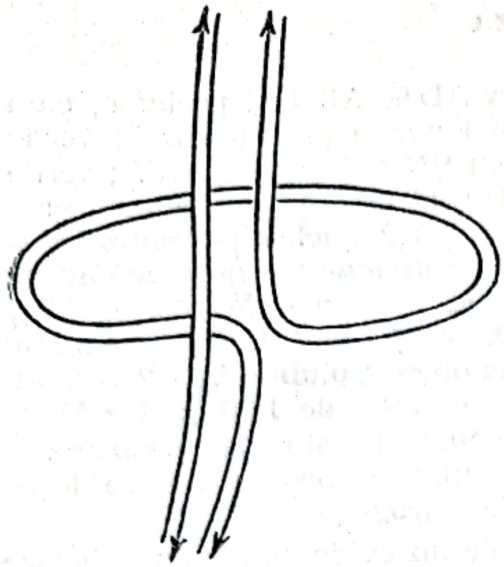


Fig. 112. Diagrama privind concepţia lui V. Sorsa în care axul cromatidei constă din două duble helixuri de ADN: unul axial şi unul care formează o buclă ce reprezintă cromomerul.

care unul este continuu, iar celălalt se desfăşoară în afară formînd o buclă groasă. Probabil că fibrele subţiri asigură continuitatea axului, apărînd dispuse paralel pe distanţe mari, iar celelalte fibre de *epicromatină* sînt mai îngroşate în dreptul buclelor, care formează benzile de *heterocromatină*.

Fiecare cromozom este legat prin kinetocor de fibrele cromozomale fusoriale, care au un Ø de 0,2—1,5 μ şi care se întind de la kinetocor pînă la unul din polii fusului. În afară de fibrele fusoriale *cromozomale*, între cei doi poli ai fusului se întind fibrele fusoriale *continue*, care ajung la 2,5 μ Ø. În fusul mitotic s-au detectat citochimic proteine, ARN, lipide, hidraţi de carbon, ATP-ază, Zn, grupări —SH care totalizează 10—20 g de material uscat din 100 cm^3 de material fusorial extras prin centrifugare diferenţială. Din această sută de mililitri de fusuri mitotice se pot izola abia 2 mililitri microtubuli. În prezent este bine stabilit că din volumul fusului microtubulii ocupă abia 4—5%, ceea ce constituie 15% din masa lui uscată. De pildă, în fusurile celulelor fetuşilor de şobolani, volumul fracţiei de microtubuli ocupă 0,055%; în secţiune transversală apar abia 1/0,03μ^3 *.

Atît birefringenţa cît şi colorabilitatea fusului sînt diferite de-a lungul lui, în sensul că ele sînt mai intense în dreptul cromozomilor şi la polii fusului şi mai slabe între ei.

Fusul este rigid, dar prezintă şi plasticitate în acelaşi timp. Este rigid pentru că poate fi scos cu totul din celulă cu acele microdisectorului sau cromozomii metafazici pot fi „traşi" cu acul de 3—4 ori fără ca lungimea fusului să scadă. Dar el are şi plasticitate, pentru că dacă un cromozom este desprins de fus acesta îşi reface fibrele. Dacă fibra cromozomală este tăiată iar cromozomul rămîne în fus, atunci el se leagă de celălalt pol al fusului.

Birefringenţa fusului dispare prin modificarea temperaturii, *p*H-ului, presiunii, acţiunii drogurilor, substituirea H_2O cu D_2O şi prin întinderea fusului, dar reapare cînd celulele vii în mitoză sînt repuse în condiţii normale de viaţă. Această labilitate este atribuită de S. Inoué (1964) unui echilibru dintre starea neorientată şi nebirefringentă şi aceea orientată şi birefringentă a fusului, deoarece cantitatea de material orientat este direct proporţională cu birefringenţa. În schimb, constanta de echilibru dintre materialul orientat şi cel neorientat este afectată de temperatură. Cu toate acestea, există o cantitate maximă fixă de material fuso-

* De un kinetocor sînt legaţi circa 7 microtubuli.

Scanned with OKEN Scanner

rial neorientat, care este dată de platoul curbei de birefringență, în funcție de temperatură.

Într-un cuvînt, fibrele fusoriale sînt atașate de kinetocorul cromozomilor și sînt atît de rigide mecanic, încît pot suporta o întindere prin tragerea cu acul microdisectorului a cromozomilor respectivi. În același timp sînt atît de labile, încît fibrele pot dispărea reversibil. Fibrele fusoriale sînt organizate de *centrii de orientare,* unde fusul are o birefringență mai mare. Asemenea regiuni organizatorice sînt kinetocorii și centriolul. Dacă fusul este iradiat, după aceea, începînd de la kinetocor spre un pol, cromozomii rămîn în tot acest timp nemișcați. Birefringența care dispare la iradiere revine odată cu refacerea fusului.

Diferiții agenți chimici pot distruge fusurile în metafază, dar în anafază nu au efect asupra acestora datorită unor profunde modificări fiziologice.

Observațiile electronmicroscopice au arătat că în fusuri se găsesc microtubuli, însă birefringența fusorială nu este datorită exclusiv acestora, deoarece fixarea face să dispară microtubulii, rămînînd totuși o birefringență de 30—50%. Dacă la fusurile fixate în aldehidă glutarică, ce produce o scădere de 50% a birefringenței, se adaugă proteine, atunci birefringența se dublează, fără să crească numărul microtubulilor în secțiune. Este clar că fusul conține și alte „materiale" decît microtubulii, care îi conferă birefringență. Într-adevăr, electronmicroscopic s-au descoperit în masa fusului o serie de componente, tot felul de substanțe dense, amorfe și filamentoase, toate asociate la microtubuli, ca și spații clare ce înconjoară microtubulii, corpi mici sferici, ba chiar și reticul endoplasmic cu ribozomi care sînt eliminați în cursul izolării fusului. Așa se face că numai o mică parte din masa și volumul fusului este ocupată de microtubuli.

În ceea ce privește compoziția cromozomilor, în prezent se cunosc două tipuri de heterocromatină : *heterocromatina constitutivă,* care este prezentă în amîndoi cromozomii omologi și *facultativă,* care rezultă din inactivarea unuia din cei 2 cromozomi X de la femelele mamiferelor, de la insecte etc. și prin care numai un cromozom din pereche rămîne funcțional. Metodele de bandare a cromozomilor au dezvăluit repartiția heterocromatinei constitutive pe cromozomii metafazici. Ea este diferită de la o specie la alta și, în cele mai multe cazuri, este prezentă la centromer *(heterocromatina centromerică),* dar formează brațele cromozomilor *(heterocromatina intercelulară)* sau la capetele lor *(heterocromatina telomerică).*

Extragerea și sedimentarea în gradient de densitate a diferitelor fracții de ADN nuclear au relevat, pe de altă parte, mai multe tipuri în funcție de densitatea de plutire. Pe lîngă fracția principală de ADN s-au mai găsit și fracții „satelite" caracterizate prin renaturarea rapidă a catenelor complementare după denaturarea acestui ADN. ADN-ul satelit este format din secvențe de polinucleotide scurte și repetate, reprezentînd, în medie, 30—40% din ADN-ul total. Analize amănunțite au arătat că ADN-ul satelit este diferit, în funcție de gradul în care se repetă secvențele, astfel :

1. *ADN înalt repetitiv* cu secvenţe polinucleotidice, de 300 nucleotide, care se repetă de 1 000 000 de ori şi care reprezintă 10% din ADN-ul nuclear.

2. *ADN intermediar* cu secvenţe ce se repetă de 1 000—100 000 de ori, reprezentînd 15% din ADN, restul de 70% fiind tocmai ADN repetitiv cu numai o copie.

3. Viruşii, bacteriile, algele albastre şi verzi au numai *ADN nerepetitiv*, cu o singură *rată de reasociere* [1] a catenelor, invers proporţională cu ADN-ul conţinut în ei. Peste 90% din ADN-ul denaturat reconstituie helixul. Temperatura la care se separă catenele este în acest caz aproape egală cu aceea a ADN-ului simplu. Greutatea moleculară a produsului de reasociere este de cîteva ori mai mare decît a fragmentelor care se alipesc. Aceste fragmente se reunesc printr-o concatenare a dublelor catene. În schimb nevertebratele, vertebratele, plantele superioare şi multe protiste conţin pe lîngă acest ADN nerepetitiv şi o cantitate de ADN repetitiv cu rate de reasociere diferite, mult mai puţin proporţională cu conţinutul în ADN per celulă haploidă. El poate fi multiplicat de peste un milion de ori. Reasocierea se face bine dacă ADN este tăiat în fragmente mici şi mai puţin dacă ADN are o greutate moleculară mare. ARN repetitiv se găseşte sub forma unor reţele datorită multiplelor interconexiuni şi prezintă un grad scăzut de stabilitate.

ADN repetitiv este localizat preferenţial în anumiţi cromozomi sau segmente de cromozomi şi în nucleoli. În interfază se află asociat cu cromatina perinucleară şi hibridează cu ADN-ul heterocromatinei tuturor cromozomilor metafazici, în afară de ADN-ul cromozomului Y. Ca funcţii, i se atribuie : „recunoaşterea" secvenţelor în replicare şi transcripţie ; de substrat al enzimelor care iniţiază recombinările genice ; ca „situs" de prindere a fibrelor proteinelor contractile care leagă cromozomii analogi în meioză ; în „recunoaşterea" centromerelor care asigură împerecherea cromozomilor omologi în meioză. După cum se poate vedea, sînt tot funcţii ce privesc „recunoaşterea" dintre părţi de cromozomi. O caracteristică a macromoleculelor nucleoproteice organizate în cromozomi este că răspund prin schimbări la modificările mediului lor exterior împăturindu-se, desfăcîndu-se sau alăturîndu-se în configuraţii caracteristice (modificările din interfază şi mitoză, în cromozomii plumoşi ai oocitelor, în cromozomii paraleli din spermatozoizi, în cromomerele diferitelor ţesuturi şi în cromozomii politenici). Aşa de exemplu, secvenţa bazelor şi lungimile genomului care produc împăturirea cromozomilor („situsurile de împăturire") permit unor părţi din cromozomi să interacţioneze direct, „împăturindu-se".

---

[1] *Reasocierea.* Prin incubarea acizilor nucleici, disociaţi în prealabil termic în catene simple, complementare, acestea se pot alătura formînd perechi de baze în cadrul unei structuri bicatenare. Se formează o catenă dublă care poate să nu existe astfel „in vivo". Optimum de temperatură este de 20—30°C, sub temperatura de „topire" a ADN, iar rata reacţiei creşte cu concentrarea cationilor. Se poate stabili un raport între concentraţia ARN sau ADN şi timpul de incubaţie (moli de nucleotide × secunde per litri) („*cot*"). Efectul acestui raport în reasociere depinde de mărimea genomului, prezenţa secvenţelor repetitive, mărimea catenei, concentraţia în cationi şi temperatura de incubaţie.

Scanned with OKEN Scanner

Proteinele legate de „sitele de impăturire" controlează, la rîndul lor, impăturirea necesară. În orice caz, sitele de înfăşurare ale cromozomilor interacţionează datorită secvenţelor lor similare cu sitele de pe cromozomi diferiţi sau de pe aceiaşi cromozomi.

9.1.3. ANAFAZA

Începe prin dublarea kinetocorilor care controlează mişcarea cromozomilor de-a lungul fusului spre cei doi poli ai acestuia. Cînd, cu excepţia kinetocorului, un cromozom este duplicat în întregime, se spune că este format din două cromatide. Cromatidele se constituie fiecare într-un cromozom imediat după ce se duplică kinetocorul, după care cei doi cromozomi se îndepărtează pe loc unul de celălalt. Forţa necesară să deplaseze un cromozom de la ecuatorul fusului la un pol al său este în jur de 10^{-8} dyne, iar energia corespunzătoare este aceea echivalentă a 30 de molecule ATP per cromozom. Ea este mai mică de 10^9 ori decît energia care se consumă în sinteza proteinelor fusoriale, cînd o moleculă de ATP foloseşte formării unei legături peptidice. Viteza cromozomilor rămîne neschimbată chiar şi atunci cînd rezistenţa la frecare creşte cu un factor de 10, datorită modificării viscozităţii fusului. La fel şi cromozomii se pot mări, viteza lor rămînînd constantă. Dealtfel, disjuncţia cromozomilor meiotici are loc cu aceeaşi viteză ca şi a celor mitotici.

Forţa care deplasează cromozomii se aplică pe kinetocor mişcînd cromozomii spre cei doi poli cu o viteză constantă, între 0,2—5 μ/minut şi, cum distanţa dintre poli este între 10—30 μ, înseamnă că o anafază durează 2—60 minute, după tipul de celulă studiată. Trebuie amintit că separarea cromatidelor în cromozomii metafazici este cu totul alt fapt decît mişcarea cromozomilor anafazici, iar cînd cromozomii se mişcă către un pol forţele acţionează asupra fiecăruia în parte şi independent de ceilalţi care se mişcă spre acelaşi pol. Aşa se face că pe fus cromozomii se mişcă cu viteze diferite şi regulat, în diferite momente, unul faţă de celălalt. Într-adevăr, dacă se elimină un cromozom anafazic prin microdisecţie, acest fapt nu afectează mişcarea spre acelaşi pol a celorlalţi cromozomi, mişcările de ascensiune către un pol fiind afectate de iradierea cu UV a fusului. O jumătate din bivalenţi continuă să se miste normal în timp ce restul se opresc la diferite distanţe de pol. Forţele acţionează individual separînd cromozomii, însă se pare că forţele care acţionează asupra a doi cromozomi-fii spre cei doi poli opuşi sînt sinergice. Dacă cromozomii se deplasează spre polii fusului cu viteze diferite, în schimb blocarea mişcării unui cromozom spre un pol afectează şi mişcarea cromozomului corespunzător către polul opus şi amîndoi cromozomii reiau mişcarea în acelaşi timp după „repararea" leziunii fusoriale.

De remarcat este faptul că numai iradierea fibrelor fusoriale opreşte mişcarea cromozomilor. S-a putut stabili că pe 80% din lungimea fibrelor, cromozomii se pot mişca într-o totală independenţă de starea materialului birefringent. Cromozomii se pot deci mişca normal şi după iradierea fibrei fusoriale cromozomale adiacente la kinetocor, fapt care produce totuşi o reducere enormă a birefringenţei.

Scanned with OKEN Scanner

Fibrele cromozomale transmit forţa de mişcare la kinetocor, fiind astfel necesare mişcării care, în metafază, este condiţionată, în plus, şi de materialul birefringent fusorial. Izolarea a 95% din masa fusorială a materialului acromatic arată că el conţine 1 g proteină la 100 ml material acromatic şi proteina corespunde la 5% din materialul acromatic viu. Materialul acromatic fusorial are două fracţii sedimentabile la 22S şi la 3,5S, ultima reprezentînd microtubulii, iar restul proteine „scheletice" fusoriale.

9.1.4. TELOFAZA

Începe în momentul cînd în jurul cromozomilor grupaţi la cei doi poli se organizează membrana nucleară prin asamblarea reticulului endoplasmatic. Constituirea membranei nucleare este inhibată de iodoacetamidă, iar substanţele legate în grupări cu sulf accelerează formarea membranei nucleare. La plantele cu procromozomi interfazici, ca şi la unii nuclei ai celulelor animale, la începutul telofazei apar mase de heterocromatină, în timp ce alte regiuni rămîn despiralizate. La nucleii de tip reticulat (la *Vicia faba, Lathyrus odoratus)* cromozomii îşi păstrează structura lor compactă pînă spre mijlocul telofazei. Asemenea cromozomi telofazici stau într-o masă fibrogranulară. La alţi nuclei de tip reticulat (la *Allium cepa, Allium porrum)* cromozomii se despiralizează la atingerea polilor celulei, între ei făcîndu-şi apariţia corpusculi sferici mici şi blocuri de substanţă fibrogranulară. În toate cazurile cromozomii telofazici sînt foarte mult desfăşuraţi, aşa că se pot vedea foarte bine cele două subunităţi care se spiralizează una în jurul celeilalte.

La *Allium porrum,* J. Lafontaine şi A. Lord, examinînd electronmicroscopic telofaze, au observat cum segmente întregi de cromozomi se orientează în direcţia polilor şi prezintă o structură alveolară. Acest fapt este interpretat ca fiind datorat prezenţei unui număr de subunităţi împachetate. Ele variază mult ca diametru ; unele, care au 0,1 μ Ø, sînt prezente la toţi cromozomii. Un nucleol tînăr apare în dreptul constricţiei secundare de pe un anumit cromozom. În interiorul nucleolilor se află un reticul cu structura fibrilară, format din dezoxiribonucleoproteine. Exteriorul nucleolilor este înconjurat de un material granular ribonucleoproteic. Pe lîngă aceste structuri, cromozomii au asociate pe suprafaţa lor *particule prenucleolare.* Pe cromozomii telofazici se văd din loc în loc structuri care amintesc întrucîtva de buclele cromozomilor „în perie de lampă".

Spre sfîrşitul telofazei cromozomii se despiralizează, nemaipăstrînd structura dublu-înfăşurată a subunităţilor, care au acum un diametru de 0,15—0,25 μ.

Dacă în unele locuri cromatidele au o grosime de 0,25 μ, în alte locuri apar foarte laxe, subţiri şi învelite de un material dens ; din loc în loc însă rămîn foarte mult supraînfăşurate, constituind *heterocromatina.* Apoi genele organizatorului nucleolar (*R*-ADN) sau locii policistronici de pe o anumită porţiune a unui cromozom transcriu ARN 45S preribozomal, însă problema originii materialului intercromozomal şi prenucleolar rămîne de rezolvat.

Scanned with OKEN Scanner

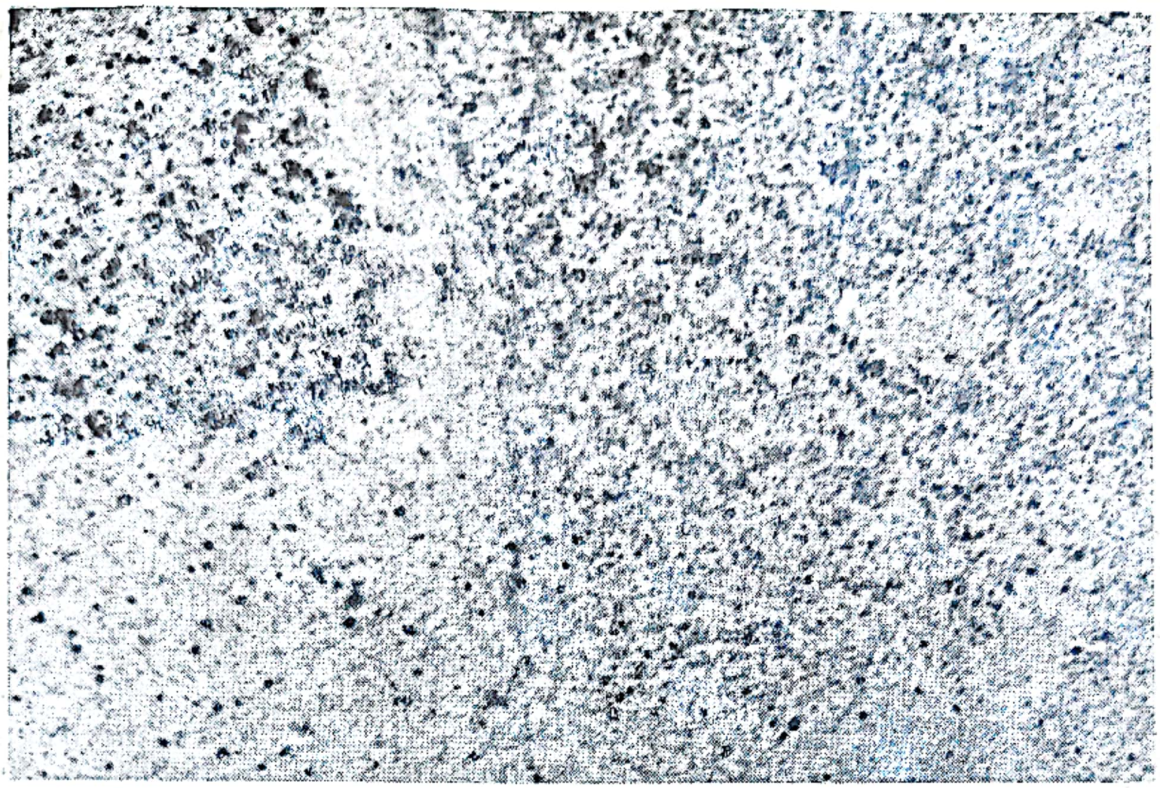


Fig. 113. Proteinele bazice din nucleol.

Materialul precromozomal se colorează cu Azur B, este degradat parţial de ribonuclează, absoarbe radiaţiile UV la 2800 Å, fiind constituit, după A. Lord, mai ales din proteine care au şi capacitatea de a reduce argintul (M. Varo, C. Tandler) (fig. 113).

Asemenea materiale prenucleolare sînt în cantitate mică la suprafaţa cromozomilor şi printre ei, pe măsură ce se organizează nucleul interfazic. În schimb, ele se adaugă la nucleolul care se constituie în jurul *R*-ADN din cromozom.

Încă din anul 1931, E. Heitz observa în micronucleii fără organizator nucleolar formarea unor noi nucleoli. Iar la mutantele de amfibieni fără organizator nucleolar, care sînt lipsite de nucleoli şi de ribozomi, nucleii formează *corpusculi ribonucleoproteici*. Nucleolii tineri apar sub forma unor corpusculi sferici a căror masă pare a fi reprezentată pe buclele fine ale cromozomului. Pe aceste bucle se află fibrile fine de *R*-ADN multiplicat, care se reîntîlnesc în zonele fibrilare ale nucleolului matur. La suprafaţa nucleolului se află un număr mic de corpusculi neregulaţi, cu o textură granulară, ca şi particulele intercromozomale. Cu alte cuvinte, mai întîi apar fibrele fine de *R*-ADN cromozomal şi apoi organizatorul nucleolar cu policistronii săi multiplicaţi de sute de ori. Apoi în cursul telofazei mijlocii apar particule în jurul părţii granulare nucleolare, care sînt identice cu acelea din zonele granulare ale nucleolului. Ele provin din anumite segmente ale cromozomilor.

Durata mitozei variază cu tipul de celule şi cu condiţiile lor de viaţă. La eucariote găsim o gamă largă de valori : *Amoeba respertilio* (5 minute), *Proteromonas* (30 minute), *Urceolaria patellae* (9—18 ore), celulele stig-

matelor de la *Avena elatior* (78—110 minute), leucocitele de broască (2 ore), *Vicia faba* (2 ore).

Viteza mitozei este în funcţie de temperatură şi se dublează la o creştere cu 10°C, conform „legii Q_{10}" a lui Van't Hoff, după care viteza unei reacţii chimice se dublează aproape la o creştere a temperaturii cu 10° (coeficientul temperaturii este 2).

De aci şi concluzia că mitoza are loc datorită unor procese chimice care îi furnizează energia necesară.

9.2. ENERGIA NECESARĂ MITOZEI

Mitoza, fiind un proces cinetic, se desfăşoară cu aport energetic, cu toate că nu s-a constatat o creştere a respiraţiei. Iar dacă unei celule intrate în diviziune i se adaugă în mediu inhibitori ai respiraţiei şi ai oxidării fosforilante, se observă că diviziunea continuă ca şi în mediul ei natural. În schimb, dacă inhibitorii amintiţi se aplică la un anumit moment înaintea diviziunii, atunci aceasta este afectată. În experienţele de intoxicare cu monoxid de carbon (CO) s-a constatat că dacă este aplicat în interfază, diviziunea va fi întîrziată cu o perioadă de timp egală cu perioada cît a acţionat CO. Dacă CO este administrat după începerea diviziunii, nu va mai avea efect asupra diviziunii ce urmează imediat, în schimb, va întîrzia diviziunea următoare. Aceste fapte experimentale duc la concluzia că energia pentru o diviziune este stocată în cursul pregătirilor pentru diviziune şi nu depinde de oxidările care au loc în timpul diviziunii.

Studiul aşa-ziselor „rezervoare energetice" (ATP, GTP etc.) şi raportul lor cu mitoza nu s-a soldat cu rezultate pozitive. Nivelul ATP nu se modifică în mod semnificativ în cursul diviziunilor la ouăle de echinoderme şi sugerează explorarea unor grupări mai puţin bogate în energie, cum ar fi ester-tiolii. La culturile sincronizate de *Tetrahymena*, E. Plesner (1973) a descris o creştere marcantă în cantitatea totală de nucleozide trifosfatice în celulele care sînt pe punctul de a se divide. Însă această creştere se face brusc, înainte de diviziune, şi nu în timpul diviziunii care ar cere o sursă imediată de energie.

S. Makino presupune că energia ar fi stocată în însuşi aparatul mitotic, dar nu în sensul că ar conţine o substanţă bogată în energie identificabilă, ci prin faptul că potenţialităţile sale sînt rezultatul unui consum energetic din timpul formării lui şi această energie se eliberează în cursul diviziunii. După terminarea biosintezelor celulare din interfază, diviziunea este precedată de o scurtă „perioadă de tranziţie", care a fost denumită *antefază* sau *preprofază*, *perioadă de prediviziune* etc.

În anafază au loc cîteva schimbări detectabile histochimic, printre care o creştere rapidă a volumului nucleului. Faptul că această creştere a nucleului este o anticipare a diviziunii este arătat prin măsurătorile cariometrice din cadrul experienţelor de „amputare" a citoplasmei la *Amoeba proteus*. Dacă se opreşte diviziunea prin amputarea citoplasmei, volumul nuclear descreşte. În acest timp nucleul devine mai bogat în ARN iar citoplasma devine mai vîscoasă, ca o consecinţă a proceselor de polimerizare premergătoare constituirii aparatului mitotic.

Scanned with OKEN Scanner

În profază, macromolecula uriașă de ADN din care este format fiecare cromozom se spiralizează și se superspiralizează. Mecanismul spiralizării nu se cunoaște încă dar experimental el se poate produce sub acțiunea unor substanțe policationice (arginina), a ionilor de magneziu, a histonelor sau poliaminelor (putresceina și cadaverina). Citochimic, se constată o acumulare de ARN în cromozomii profazici și cedarea lui în anafază, aceste procese fiind corelate, după unii cercetători, cu mecanismul spiralizării și despiralizării și cu cel al dezintegrării și reconstrucției nucleolului.

G. Pelling, L. Goldstein și J. Micou au stabilit că brațele cromozomilor sînt primele locuri de sinteză ale ARN, care este apoi transportat la nucleoli, dar și în citoplasmă. L. la Cour și J. Chayen (1958) au descris un fapt interesant și anume, proprietatea regiunilor eucromatice ale cromozomilor de a se colora cu orange-G, începînd de la mijlocul profazei și pînă la telofază. Nucleolii, de asemenea, se colorează cu orange-G, dar cromozomii încep să rețină pigmentul înaintea dispariției nucleolului. Autorii mai sus citați consideră că prin orange-G se colorează specific fosfolipidele, așa că s-ar putea vorbi de un *ciclu cromozomic fosfolipidic,* care ar corespunde cu ciclul ARN. Posibilitatea ca afinitatea pentru orange-G să se datoreze ARN a fost exclusă deoarece ea se manifestă și după acțiunea ribonucleazei. Desigur, că se admite o asociere între ribonucleoproteinele și lipoproteinele celulare. Este de luat în seamă și coloratia cu pararozanilină-verde metil, în care nucleolii și mitozele apar de culoare roșie strălucitoare, cromatina și heterocromatina albastre iar citoplasma albastră deschis.

În profază are loc și *stabilirea polilor de diviziune* prin separarea centriolilor și migrația lor la cei doi poli opuși. Migrația centriolilor se datorește alungirii fibrelor intercentriolare care constituie fusul central de diviziune. Ele se alungesc cu 1,5%/minut și distanța maximă dintre doi centrioli ajunge pînă la 34 microni. În cadrul multor celule animale nucleolul „dispare", adică partea sa amorfă se reduce treptat iar cea granulară și fibrilară se încorporează la cromozomi.

În telofază, nucleolul se reorganizează prin asocierea acestor aglomerări la care se adaugă material nou sintetizat de organizatorul nucleolar. Prin adausul în concentrații mai mici de săruri de Co, Zn, Ag la culturi celulare, se împiedică dispariția nucleolului și el persistă intact de-a lungul diviziunii. La sfîrșitul profazei, membrana nucleară se fragmentează în citoplasmă unde apare ca lamele inelate. Dacă această dezorganizare a membranei este inhibată, cromozomii continuă să se condenseze, formîndu-se cromozomi intranucleari și mai scurți.

Sfîrșitul profazei este marcat de polimerizarea fibrelor fusoriale care vor lega kinetocorii de centrioli. În premetafază cromozomii se mișcă spre planul ecuatorial, formînd placa metafazică. Cauzele acestor mișcări sînt atribuite interacțiunilor dintre poli și centromere.

În metafază se constituie aparatul mitotic pe deplin polimerizat, cu placa ecuatorială metafazică. Cromozomii sînt astfel orientați în placa ecuatorială încît kinetocorii se află pe axul lung al fusului acromatic, iar cromatidele stau perpendicular pe el. Pe kinetocorul fiecărui cromozom se inseră două grupe de fibre cromozomale care se termină fiecare la cîte

Scanned with OKEN Scanner

o extremitate a fusului. După ce cromozomii au stat un timp în metafază (la sarcomul Yoshida 31 minute, la celula de *Mus musculus* în cultură 6—15 minute, la fibroblaştii de *Triton* 17—38 minute, la neuroblaştii de acridide 13 minute, la endospermul de *Iris* 10—30 minute) se produce scindarea kinetocorului, care marchează începutul separării complete a celor două cromatide cromozomale. Cei doi cromozomi monocromatidici rezultaţi în urma diviziunii kinetocorului încep să migreze fiecare în sens opus, în care caz se ajunge la anafază.

Mişcările cromozomilor anafazici, în ascensiunea lor spre cei doi poli, se realizează cu o forţă de 10^{-8} dyne. Energia cheltuită este egală cu 30 molecule de ATP şi este suficientă să deplaseze un cromozom de la ecuator la pol cu o viteză de 0,2—5,0 microni/min. Aceste 30 de molecule de ATP pot fi defosforilate într-o secundă de o moleculă de dineină (ATP-aza cililor). Apoi, în telofază, reticulul endoplasmatic se dispune în jurul celor două grupuri de cromozomi ajungînd şi la cei doi poli ai fusului.

Reconstrucţia învelişului nuclear este grăbită de compuşi sulfhidrici şi inhibată de iodacetamină. Simultan cu apariţia nucleolului cromozomii se despiralizează, uneori se unesc în grupuri, alteori se formează aşa-numitele „vezicule cromozomale" sau se contopesc.

La sfîrşitul diviziunii apare o „invazie" de reticul endoplasmatic cu ribozomi spre ecuatorul fusului, care se îmbogăţeşte în ARN, la care se adaugă material fusorial polar disociat.

Şanţul de diviziune al celulelor se realizează prin contracţia inelului de microfilamente ecuatoriale, care adîncesc şanţul din ce în ce, făcînd ca cele două celule-fiice să se separe. Ca probă a acestui fenomen este influenţa citochalazinei beta care, într-o concentraţie mică, abia de 1 mg/ml, blochează formarea şanţului de diviziune a celulelor He La în cultură şi determină formarea unor celule multinucleate.

9.3. BALANŢA DE CALCIU

Poate fi, cel puţin în unele cazuri, un regulator esenţial al proliferării celulare. J. Whifield (1973) a dovedit acest fapt lucrînd pe măduva osoasă şi pe timus de şobolan. O expunere bruscă a limfoblaştilor timici la o concentraţie de calciu mai mare de 1,0 mM inhibă degradarea unei enzime din membrană şi anume a fosfodiesterazei (PDE) care, altfel, atacă adenozinmonofosfatul ciclic (c-AMP). Acesta din urmă se formează din ATP în membrana celulară sub acţiunea adenilat-ciclazei. Complexul adenilat-ciclază este constituit dintr-un receptor extern ataşat de partea catalitică prin porţiunea regulatoare *(reg.)*. AMP-ciclic stimulează părţile din membrană *M* (mitogenetice) şi *D* (sinteza ADN) ale sitelor de activare pentru producerea iniţiatorilor *X* (reacţii mitogenetice) şi *Y* (procese de sinteză a ADN). Sub influenţa hormonului paratiroid, calciul intră din plasma interstiţială în membrana celulară. La fel ca şi la adausul experimental de calciu şi în această situaţie se inhibă fosfodiesteraza, ceea ce duce la o creştere a concentraţiei AMP ciclic şi care, la rîndul său, stimulează sitele de activare membranare ale producerii iniţiatorilor *X* şi *Y* (fig. 114).

Scanned with OKEN Scanner

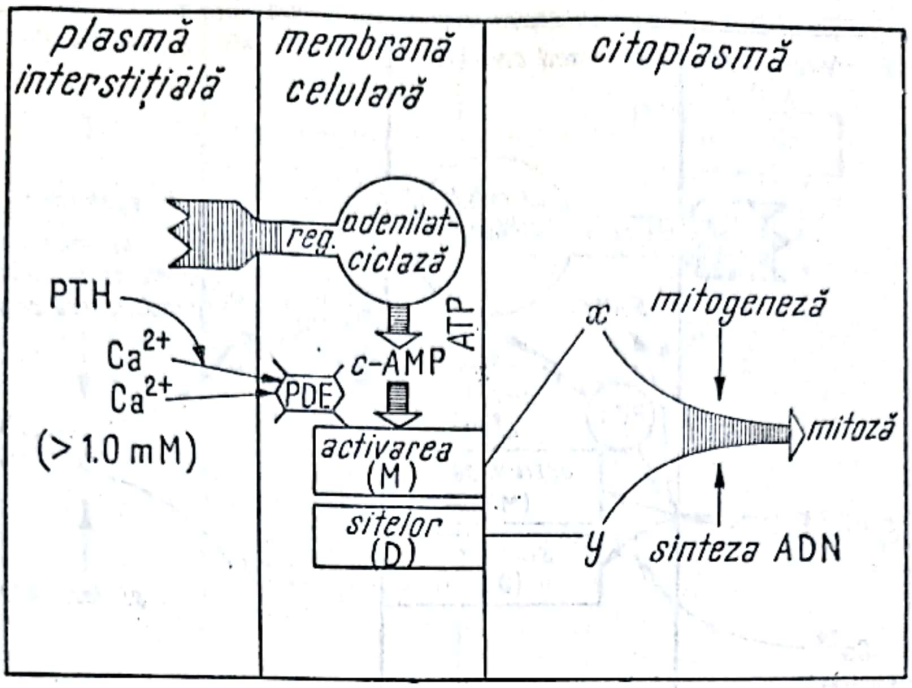


Fig. 114. Schema lui J. Whitfield (1973) privind Ca^{2+} al plasmei interstițiale, cînd este în concentrație mai mare de 1,0 mM și cînd este introdus în celulă sub acțiunea parathormonului (PTH).

Adenozinmonofosfatul ciclic (c-AMP) exogen nu pătrunde în celulă ci se leagă necovalent-reversibil la situsurile de activare membranare, care produc inițiatorii X și Y. Aceștia pătrund în celulă și declanșează procesele mitogenetice și sinteza ADN. La fel acționează și c-AMP endogen, format pe seama ATP datorită adenilat ciclazei. Nivelul de c-AMP în dreptul sitelor de activare este determinat de ratele cu care este produs de ATP și degradat de fosfodiesteraza membranară. Acțiunile stimulatoare ale unor foarte mici concentrații de c-AMP sînt grăbite de ionii calciului extracelular (fig. 115).

Limfoblastele timice în cultură fără calciu pot fi stimulate să se dividă printr-o cantitate de 5,0 µg/ml de prostaglandină care activează complexul adenilat-ciclazei din membrana celulară, determinînd brusc formarea unei mari cantități de c-AMP. Nucleotidul ciclic acționează asupra sitelor de activare membranare pentru producerea inițiatorilor reacțiilor mitogenetice și a sintezei ADN. O parte de c-AMP pătrunde în celulă, dar cum nivelul calciului este foarte scăzut, iar situsurile de legare ale calciului nu sînt încărcate, nucleotidul nu eliberează destul calciu care să afecteze procesele mitogenetice (fig. 116).

Prin adaus de calciu în mediul de cultură se încarcă sitele de calciu intracelulare cum sînt, de pildă, mitocondriile. O parte din c-AMP nou sintetizat sub acțiunea prostaglandinei care intră în citoplasmă stimulează ieșirea calciului din aceste site. Ieșirea calciului inhibă procesul mitogenetic inițiat de X, fără ca să afecteze biosinteza ADN prin Y. Prin urmare, inițierea sintezei ADN este stimulată de prostaglandină, dar celulele stimulate „in vivo" nu intră în diviziune (fig. 117).

Scanned with OKEN Scanner

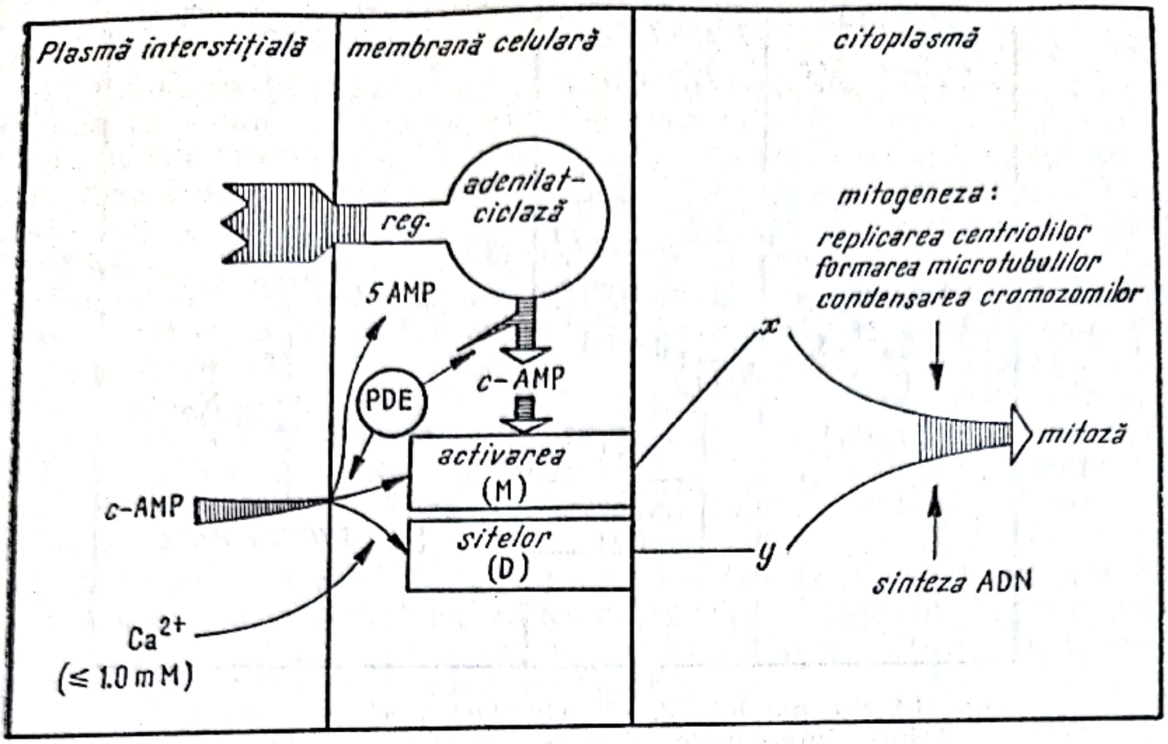


Fig. 115. Schema lui J. Whitfield (1973) însumînd mecanismele posibile prin care c-AMP exogen și endogen stimulează sinteza și proliferarea limfoblaștilor timici.

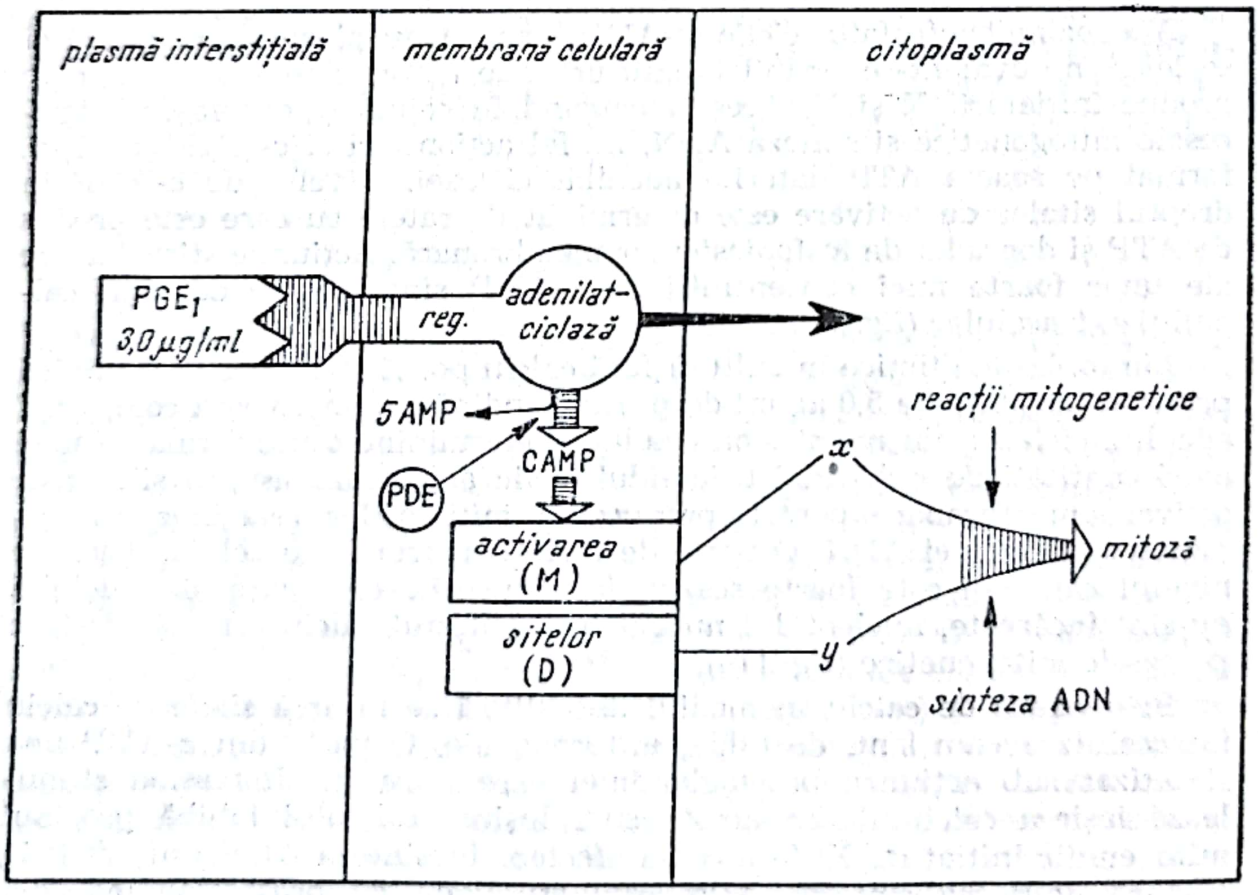


Fig. 116. Mecanismul în care o mare concentrație de prostaglandină E_1 stimulează sinteza ADN și proliferarea limfoblaștilor timici într-un mediu MAC-1 fără calciu (după J. Whitfield, R. Rixon, J. Mac Manus și S. Balk).

Scanned with OKEN Scanner

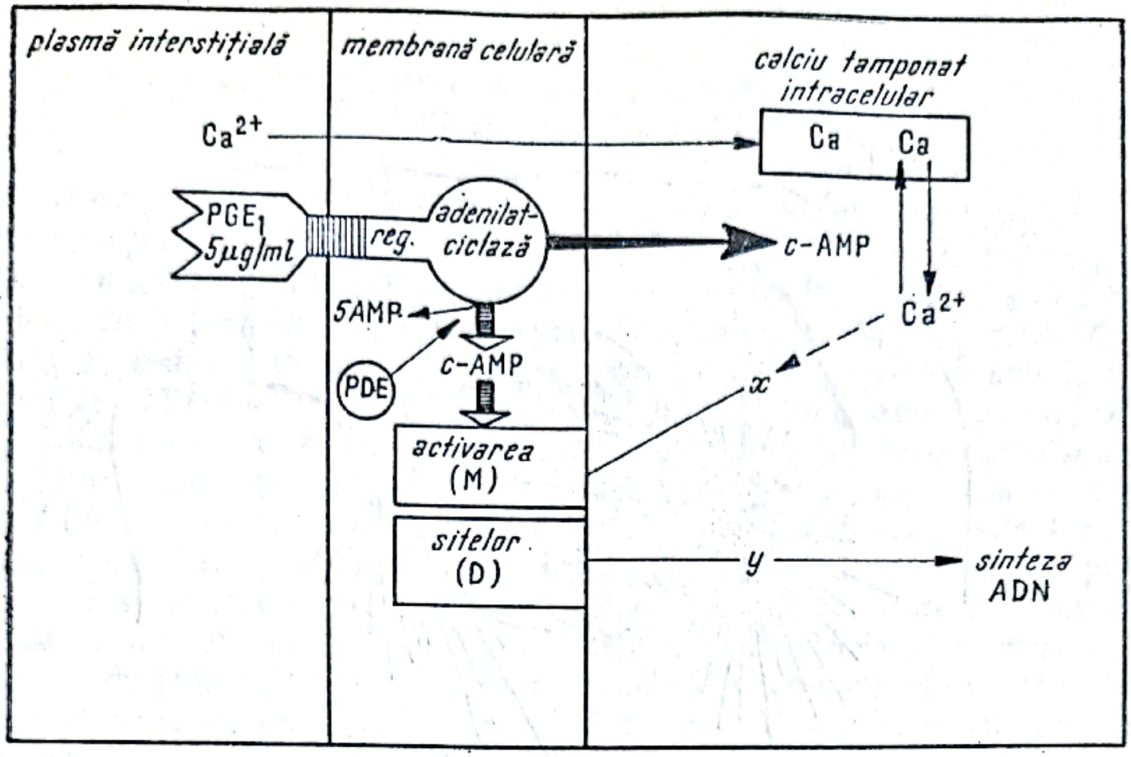


Fig. 117. Mecanismul posibil (după J. Whitfield) prin care calciul inhibă fluxul de prostaglandină E_1 (PGE_1) ce stimulează mitoza limfoblaștilor timici.

9.4. TIPURI DE MITOZĂ

P. Grassé deosebește două procese mitotice fundamentale și, în același timp, primordiale, care se întîlnesc la protozoare: *ortomitoza* și *pleuromitoza*. La amibele de tip limax, la *Euglypha* și *Chrysomonadinae*, membrana nucleului nu se dezorganizează în timpul diviziunii celulare, iar nucleul se integrează în fusul acromatic. Kinetocorul cromozomilor se prinde de fibrele cromozomale fusoriale și formează o placă ecuatorială cromozomică.

Aceasta este ortomitoza *tipică*, din care, cu sau fără concursul centrozomilor și prin dispariția membranei nucleare, a derivat mitoza *propriu-zisă*.

Pleuromitoza se caracterizează printr-un fus dezvoltat și aplicat pe membrana nucleului, iar cromatidele-fiice se separă prin centromere fără ca fusul să aibă vreun rol. Este cazul unor *Hipermastiginae* (fig. 118 și 119).

La protozoare, A. Hollande (1972) a remarcat persistența membranei nucleare în timpul cariokinezei, de unde și numele de *criptomitoză* pe care l-a dat diviziunilor celulare. Și, după cum și fusul are o localizare extra- sau intranucleară, după cum segregația cromatidelor este sau nu bine sincronizată cu separarea centrilor cinetici, este posibil, după Hollande, să existe 4 tipuri fundamentale de criptomitoză.

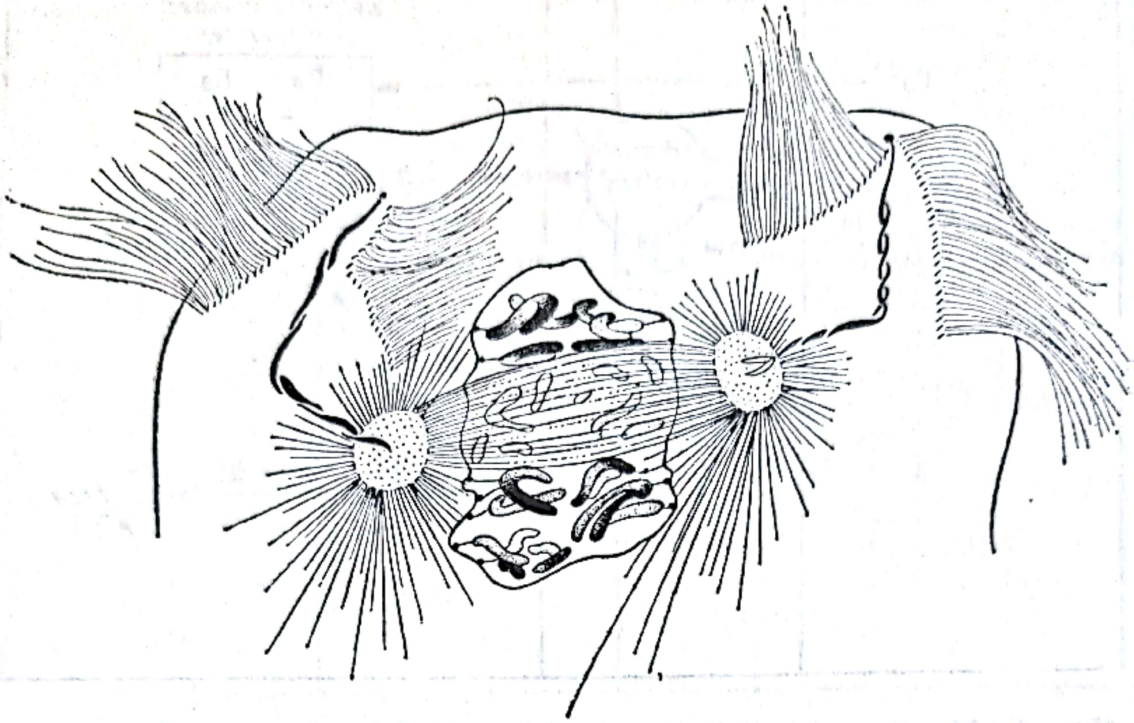


Fig. 118. Mitoza de la *Barbulonympha* — partea anterioară a celulei (anafaza) (după Cleveland).

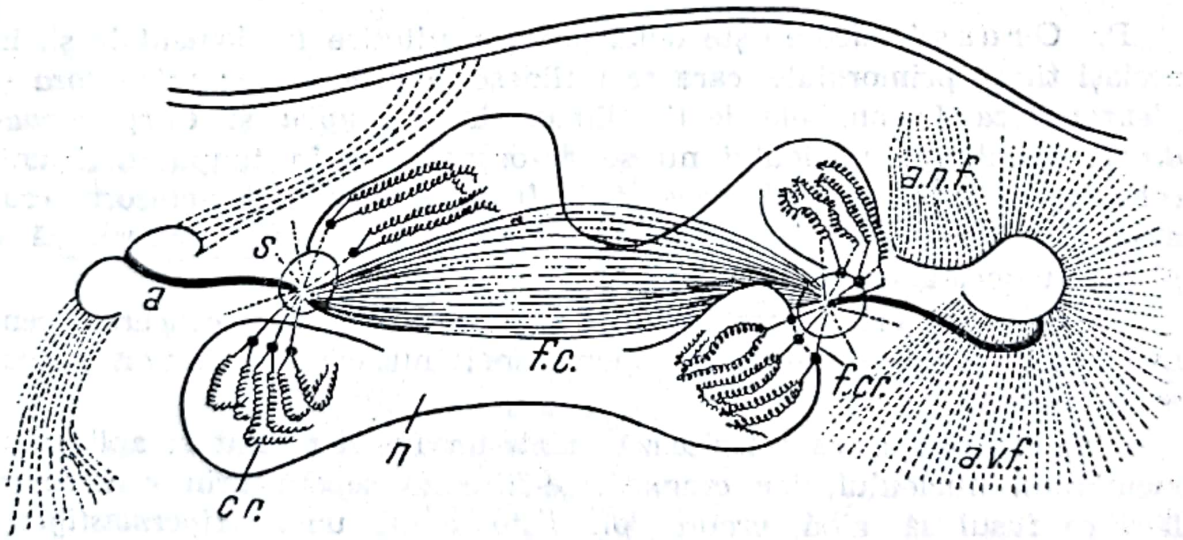


Fig. 119. Sfîrșitul telofazei de la *Barbulonympha ufalula* (după A. Hollande și J. Valentin):

a — atractoforul, organit cu o dublă potențialitate de a induce formarea fusului și de a-l pune în contact cu nucleul în timpul cariokinezei ; *s* — sferă de arheoplasmă de la capătul atractoforului ; *a.v.f.* — arie veche flagelară ; *a.n.f.* — arie nouă flagelară ; *cr.* — cromozomi ; *f.cr.* — fibre cromozomale ; *fc.* — fibre continue ; *n* — nucleu.

Scanned with OKEN Scanner

9.4.1. CRIPTOMITOZA CU FUSUL EXTRANUCLEAR ȘI CRIPTOPLEUROMITOZA

La dinoflagelatul *Merodinium belari*, parazit pe radiolarul *Collozoum*, Monique Enjumet și A. Hollande au descris o criptopleuromitoză, astfel : cinci cromozomi în formă de *V*, cu vîrfurile îndreptate spre un centru cinetic ce apare în profază, constituie o rozetă a căror 10 ramuri sînt formate fiecare din cîte două cromatide spiralizate. Apoi se individualizează un fus foarte subțire și lung, extranuclear, perpendicular pe axul mare al nucleului și ale cărui fibre cromozomale sînt ușor înclinate față de fibrele continue. Cromozomii, foarte spiralizați și fără histone, se prind cu centromerele la ecuatorul fusului, atîrnîndu-le brațele de o parte a lui. Apoi segregarea cromatidelor rezultă din jocul antagonist al fibrelor fusoriale continue cu acela al fibrelor cromozomale, în sensul în care primele se lungesc, iar ultimele se scurtează. În timpul diviziunii, cromozomii se dedublează în cromatidele constitutive, perfect sincron, separarea începînd din vîrful *V*-ului și continuîndu-se la extremitatea celor două brațe. În același timp, cele două stocuri de cromatide rămîn asociate în chip de rozetă (fig. 120); ca și în profază, cele două rozete basculează încet, despărțindu-se în direcții opuse.

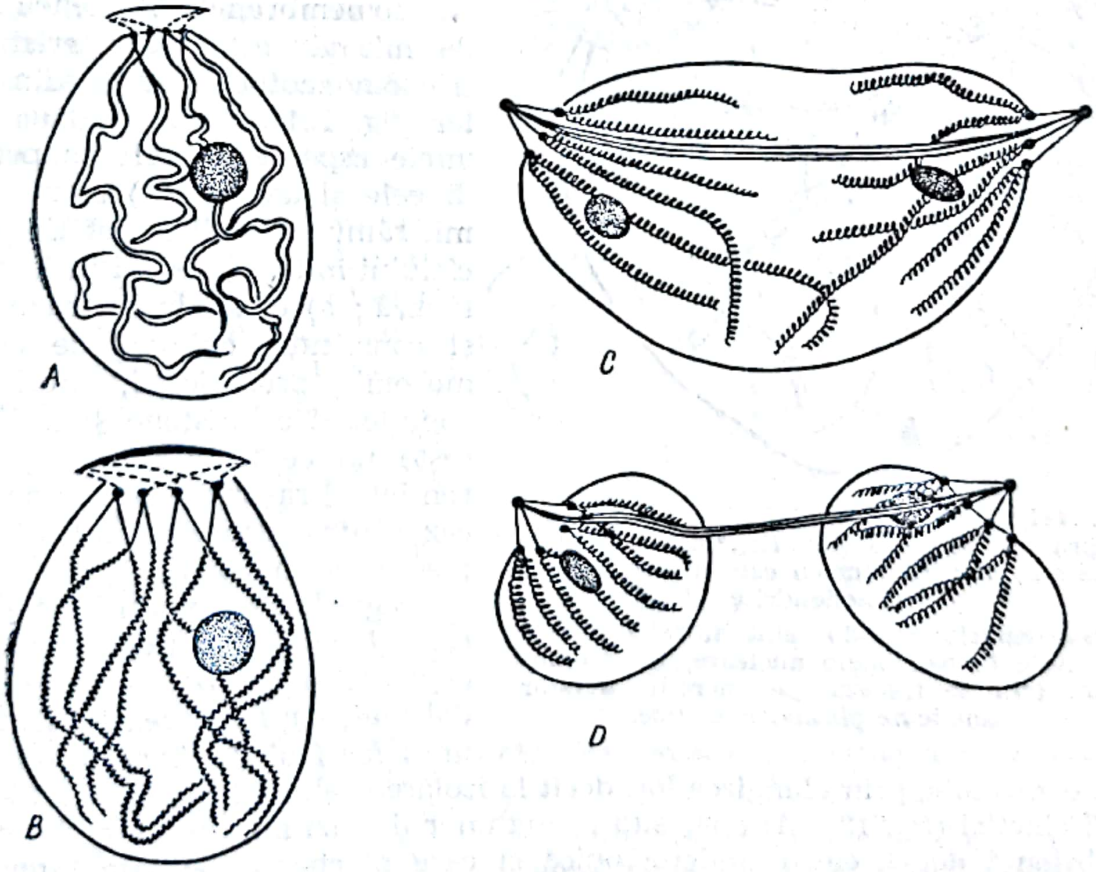


Fig. 120. Cariokineza la *Merodinum belari* :
A — profază ; *B* — metafază ; *C* — anafază ; *D* — telofază.

Scanned with OKEN Scanner

Criptomitoza cu semifusuri care depind de centrii cinetici intranucleari de la ascomicete, foraminifere şi radiolari se caracterizează prin aşezarea centrilor cinetici pe foiţa internă a membranei nucleare şi prin asocierea foarte precoce a acestor centri cu centromerele celor două cromatide, împărţind fibrele fusoriale în două semifusuri, astfel :

— criptomitoza cu semifusuri care depind de centrii cinetici intranucleari ;
— criptomitoza cu semifusuri care depind de centrii cinetici extranucleari ;
— criptortomitoza de tipul metazoarelor, cu aria nucleară limitată parţial de către membrana nucleară.

Criptopleuromitoza. Se caracterizează prin localizarea intracitoplasmatică a fusului ale cărui fibre cromozomale se adună în fascicule independente de fibrele continue. Centromerii sînt înfipţi în membrana nucleară, deoarece nu se constituie o placă ecuatorială metafazică, iar uneori cromozomul se localizează numai pe o parte a regiunii ecuatoriale a fusului. Cromatidele se separă prin jocul antagonist al fibrelor cromozomale şi ale celor continue, după care cele două părţi de cromatide-surori migrează spre cei doi poli ai fusului datorită neoformării materialului nucleomembranei. Asemenea fel de mitoză este caracteristică trichomonadinelor şi peridineelor (fig. 121). Trebuie adăugate unele aspecte ce privesc peridineele şi anume : *a*) cromozomii rămîn vizibili în tot timpul ciclului mitotic, deci şi în interkineză ; *b*) ei au infrastructură şi constituţie chimică de cromozomi procariotici, nefiind completaţi cu histone şi le lipseşte un centromer bine diferenţiat ultrastructural ; în acest caz centromerii stau înfipţi în membrana nucleară.

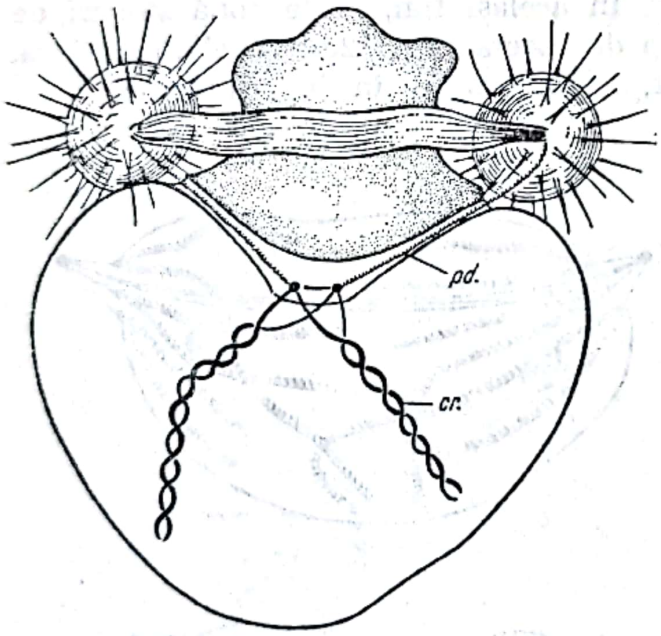


Fig. 121. Interpretarea lui A. Hollande asupra cariokinezei dinoflagelatelor (dinomitoza) al cărui nucleu este traversat de plasmodendrite.

Plasmodendritele (*pd.*) sînt fibre fusoriale conţinute în canalicule nucleare, iar cromozomii (*cr.*) se fixează pe pereţii acestor canalicule plasmodendritice.

Segregarea cromatidelor este condiţionată tocmai de migrarea centrilor de diviziune către cei doi poli, iar formarea tardivă a unui fascicul de fibre continue nu contribuie, prin alungirea lor, decît la izolarea celor doi nuclei-fii. Centrii cinetici (fig. 120, *A*) apar sub forma unor discuri mici formaţi dintr-o substanţă densă electronmicroscopică şi care plachează pe faţa internă membrana nucleului. În interkineză, fibrele cromozomale rămîn sau nu asociate la cromozomi, care se îngroaşă în timpul profazei şi se duplică în

Scanned with OKEN Scanner

cromatide dispuse una peste alta, fisurate, apoi se scurtează și are loc dedublarea centriomerilor. În acest moment, placa cinetică suferă o autoduplicare și cele două plăci-fiice rămîn alăturate, generează cîte un semifus ale cărui fibre se leagă cu unul din cele două loturi de cromatide.

A. Hollande își imaginează că are loc o sinteză a materialului nucleomembranar dintre cele două centre cinetice, care sînt astfel depărtate unul de celălalt, antrenînd și cromatidele lor. Bineînțeles, asemenea mitoze se termină cînd centrii cinetici ajung la cei doi poli opuși ai nucleului. Individualizarea tîrzie a fibrelor continue dintre centrii cinetici, alungirea lor, mărirea suprafeței membranei nucleare sînt evenimente care finalizează diviziunea nucleului. Este de remarcat accelerarea ritmului mitozei — caracteristică protistelor — situație în care duplicarea cromozomilor în loc să aibă loc în profază se realizează în telofaza mitozei precedente și fiecare din polii nucleului telofazic este polarizat de către doi centri cinetici în loc de unul.

9.4.2. CRIPTOMITOZA CU SEMIFUSURI CE DEPIND DE CENTRII CINETICI INTRACITOPLASMATICI

Se întîlnește la sporozoare, gregarine și coccidii la care cariokineza este tipic criptomitotică. În acest caz cele două semifusuri se constituie imediat după duplicarea centrului cinetic. Mai întîi ia naștere un fus normal, cu filamente cromozomale și continue. Un astfel de fus întreg poate să apară fie în timpul, fie după ce au migrat centrii cinetici la doi poli opuși ai nucleului, dar niciodată formarea sa nu este concomitentă cu momentul despărțirii cromatidelor (fig. 122).

Astfel, la coccidianul *Aggregate eberthi* și la gregarinul *Grebniekiella gracilis*, centrii cinetici sînt în citoplasmă, iar semifusurile care converg spre ei sînt nucleare. În profază, centrul cinetic se leagă de membrana nucleară prin fibre cromozomale, formînd un *centrocon* care se află cu baza pe membrana nucleului. Diviziu-

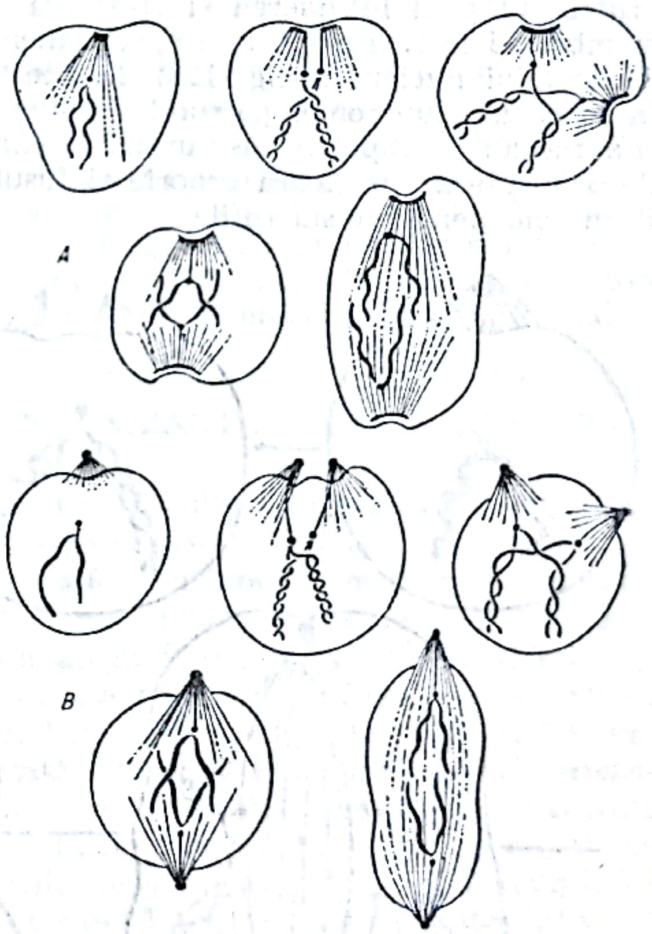


Fig. 122. Schema criptomitozelor cu semifusuri :

A — criptomitoza cu semifusuri ce depind de centrul cinetic intranuclear ; *B* — criptomitoza cu semifusuri ce depind de centrii cinetici intracitoplasmatici (după A. Hollande).

Scanned with OKEN Scanner

nea începe cînd se aplică centroconul pe membrana nucleară și are loc alungirea fibrelor cromozomale care se asociază în două semifusuri. Acestea pătrund în nucleu și se leagă de centromerele unuia sau altui lot de cromatide. Membrana dintre cele două centroconuri crește, despărțind centrii cinetici și, odată cu ei, și cele două loturi de cromatide. Separarea acestora se termină cînd cele două centroconuri ocupă poli opuși pe nucleu. Individualizarea unui fus cu fibre continue duce la izolarea a doi nuclei-fii.

9.4.3. CRIPTORTOMITOZA

Se caracterizează printr-un fus tipic, cu o placă ecuatorială cromozomală evidentă. Alungirea fibrelor cromozomale, care depinde de centroconuri este întîrziată, deoarece mai întîi migrează centroconurile la polii opuși ai nucleului. Mitoza își schimbă aspectul din criptomitoză cu semifusuri, în criptortomitoză. Placa ecuatorială ia naștere la unele protozoare prin întinderea și creșterea localizată la un moment dat a membranei nucleare. La alte specii, membrana se dezorganizează la cei doi poli ai nucleului (fig. 123). În acest fel fibrele fusoriale, disociate în fascicule autonome, pătrund în nucleu, apoi cromozomii se despart și alunecă spre capetele fusului, iar la sfîrșit fiecare dintre ei se înconjură de o membrană nucleară proprie și fusul apare sub forma a patru cordoane independente siderofile.

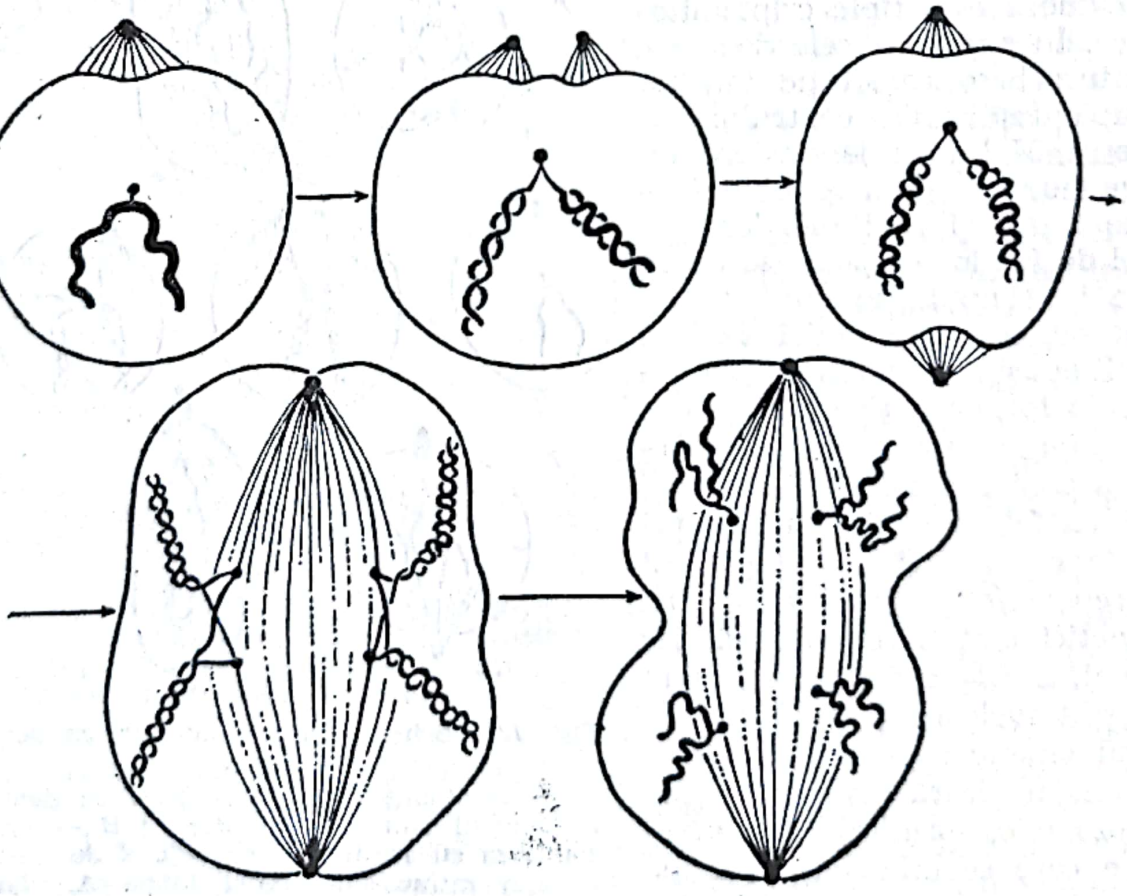


Fig. 123. Schema fazelor criptortomitozei.

Scanned with OKEN Scanner

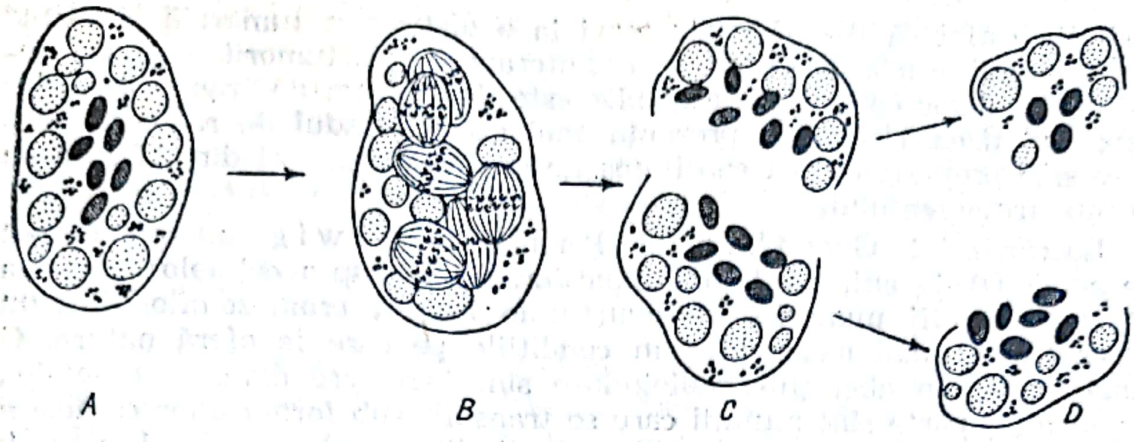


Fig. 124. Comportarea nucleului compus de la *Tracheloraphis phoenicopterus* în cursul diviziunii :

A — nucleul interfazic cu 6 micronuclei *(în negru)* și cu un număr de macronuclei *(punctat)*; *B* — diviziunea micronucleilor; *C*, *D* — separarea loturilor de micro- și macronuclei în două formațiuni nucleare (după Raikov).

Asemenea mitoze cu semifusuri au loc într-un timp scurt și se succed într-o cadență rapidă. În urma unor asemenea criptomitoze semifusoriale multiple, care se succed într-un ritm accelerat, fără ca să se mai individualizeze nucleii-fii, protozoarul ajunge să aibă un grad mare de ploidie. Atunci nucleul se lobulează, după care se fragmentează în două sau trei porțiuni care, la rîndul lor, se vor fragmenta din nou într-o serie de unități independente cu cîte un lot de cromozomi fiecare. Așa se formează *nucleii secundari* care se împrăștie în endoplasmă, continuînd să se multiplice neîncetat (fig. 124).

9.5. INFLUENȚA RADIAȚIILOR IONIZANTE ASUPRA NUCLEULUI

Problema a fost studiată atît la o anumită fază, pe culturi în platou sau exponențiale, cît și conjugată cu acțiunea diferiților represori.

Prin iradierea celulelor în mitoză, diviziunea următoare va fi mult întîrziată. Sensibilitatea celulelor este mult scăzută în *G*-1 timpuriu, apoi crește ajungînd la un maximum în *S*, pentru ca în *G*-2 să prezinte alt maximum. În același timp, durata ciclului se mărește. Studiindu-se efectele radiațiilor pe culturi celulare de hamster pretratate cu 5-brom-deoxiuridină (5-BUDR) se constată existența a două subunități cromozomale în *G*-1 care se separă la sfîrșitul acestei faze sau în momentul începerii fazei *S*. Sensibilizarea celulei în aceste tipuri de experiențe se traduce prin distrucții cromozomale așa încît în *S*, după replicarea ADN și încorporarea 5-BUDR doar pe o catenă, cromozomii sînt intacți, în *G*-1 nefiind sensibili razelor X. Abia după o replicare consecutivă și o marcare a celor două catene cu 5-BUDR apare și o sensibilizare a celulei în G-1. La administrarea de 5-bromo-2′-deoxicitidină (5-ACDR) în faza de trecere de la creșterea exponențială la cea în platou, la o cultură de celule de mamifere se produce o sensibilizare foarte mare a culturii la

radiații, astfel că BUDR poate servi la o distrugere tumorală „în situ" prin radiații, o adevărată excizie radioterapeutică a tumorii. Desigur, numărul celulelor care devin sensibile este determinat de fracția celulelor care sintetizează ADN în prezența analogului. Gradul de radiosensibilizare este proporțional cu cantitatea de analog al timinei din ADN și cu durata tratamentului.

Lucrările lui Gunther și Paula Hertwig au arătat, încă de acum 60 de ani, rolul radiațiilor ionizante asupra celulelor. Acestea produc alterații numerice și structurale asupra cromozomilor într-un procent mult mai mare decît în condițiile pe care le oferă natura. O bună parte din aberațiile radioinduse sînt caractere dominante letale ; o mai mică parte sînt mutații care se transmit sub forma unor caractere deosebite de-a lungul generațiilor. Radiațiile produc aceleași aberații cromozomale în cromozomii omului, animalelor și plantelor, adică deleții simple sau interschimbări.

Teoria lui Sax, Lea și Catchesid consideră că delețiile simple sînt datorită loviturii unui singur electron dată pe un cromozom, iar interschimburile sînt consecința reunirii aberante a rupturilor cromozomale provocate de două sau mai multe impacte electronice. Revell susține însă că, indiferent de tipul aberației induse, modificarea structurală provocată este un interschimb. În cazul deleției simple, interschimbul se produce la nivelul unui singur cromozom (intraschimb) și incomplet, deoarece numai o singură ruptură suferă procesul de reunire. În perioada presintetică, radiațiile ionizante induc aberații cromozomale cromatidiene, iar în profază sînt subcromatidiene. Redăm, în continuare, *tipurile de aberații cromozomale* structurale :

— *tipul cromozomal,* realizat prin ruperea ambelor cromatide la același nivel. După locul rupturii, numărul de cromozomi afectați și reunirea capetelor rupte se înregistrează diferite forme ale delețiilor : ale cromozomilor inelari, ale microcromozomilor, ale inversiilor pericentrice și paracentrice, ale translocațiilor reciproce, ale dicentrilor ;

— *tipul cromatidian* este atunci cînd leziunea deteriorează o singură cromatidă, avînd drept urmare : deleții terminale, intercelulare, izocromatidiene, duplicații, inversii, interschimburi simetrice sau asimetrice. Leziunile acromatice sînt modificări care nu reprezintă rupturi ale cromatidei, ci leziuni reparabile fără urmări permanente în structura cromozomilor. Frecvența rupturilor cromatidiene este de 3 ori mai mare în G-2 decît în S ;

— *tipul subcromatidian* de modificări produse de agenți fizici sau chimici care acționează în profază sau în cursul meiozei. El produce aberații care interesează subunități de cromatide, realizînd interschimburi.

Aberațiile cromozomale numerice — *aneuploidii și poliploidii* — au o semnificație genetică atunci cînd se petrec în celulele germinale.

Repararea leziunilor cromozomale induse prin radiații pe limfocitele mici ale omului este realizată în cultură, după 20 de ore de la stimularea lor cu fitohemaglutinină, așa cum a arătat Tr. Ștefănescu la trecerea limfocitelor G_0 în G_1. Rata proceselor de reunire este constantă

Scanned with OKEN Scanner

în toate perioadele ciclului, iar numărul de rearanjamente sporit în G_2 față de G_1. Acest fapt denotă o multiplicare a numărului de puncte de contact dintre cromozomi. Procesul de reunire al catenelor rupte nu este afectat de inhibitorii sintezei ADN, el efectuîndu-se independent de aceştia ; în schimb, reparaţia este împiedicată de agenţi chimici care opresc sinteza ARN sau a proteinelor.

9.6. INFLUENŢA CITOSTATICELOR ASUPRA NUCLEULUI

Studiul citostaticelor este legat de chimioterapia oncologică şi el progresează continuu. Aceste substanţe metabolizabile trec printr-o serie de modificări în organism care privesc modul de absorbţie, legarea de proteinele plasmei, trecerea prin membrana celulară, transformările biochimice, excreţia prin ficat, rinichi şi pulmon. În cursul acestor etape ele sînt activate şi inactivate. Efectul citostaticelor se traduce printr-o leziune biochimică anumită asupra acizilor nucleici sau a proteinelor, care se manifestă prin perturbarea sau inhibiţia mitozei.

Răspunsul imun este caracterizat de indici de proliferare celulară crescuţi, citostaticele, ca agenţi antiproliferativi, avînd un efect imunosupresiv total sau parţial. Dar, spre deosebire de acţiunea serului antilimfocitar, afectarea supresivă a răspunsului imun nu este specifică, deoarece acţiunea citostaticelor nu se efectuează numai asupra celulelor angajate în răspunsul imun al oricărui sistem celular, caracterizat printr-o înoire celulară rapidă şi extensivă. Agenţii alkilanţi sînt toxici atît pentru celulele tumorale cît şi pentru hematopoeză. Cele mai multe chimicale produc rupturi de cromozomi în perioada sintezei ADN, iar altele înainte şi după această sinteză. Mecanismele biochimice ale proceselor citostatice sînt : inhibiţia sintezei de dezoxiribonucleotide (fluordezoxiuridina, arabinozidele) ; degradarea sau denaturarea ADN (streptonigrina) ; producerea de ADN anormal şi labil prin reacţii biochimice sau prin încorporarea precursorilor anormali (agenţii alkilanţi, bromdezoxiuridina) ; schimbarea legăturilor ADN-metal (alkilanţi). Efectul multor citostatice este puternic favorizat de integritatea fosforilării oxidative care se ştie că produce ATP, deoarece reducerea la 50% a cantităţii ATP antrenează după sine inhibarea mitozei.

Citostaticele se împart în : alchilanţi antimetaboliţi, antibiotice, alcaloizi şi hormoni.

Alkilanţii. Agenţii anticanceroşi citostatici sînt în general substanţe de tip alchilant bifuncţional, avînd deci două poziţii cu potenţial reactiv, capabile de a reacţiona cu acizii nucleici, în special cu atomul 7 al guaninei.

Efectul alkilării care se manifestă faţă de ADN este eficient cînd agentul alkilant este bifuncţional, acesta avînd proprietăţi antitumorale crescute faţă de agenţii alkilanţi monofuncţionali.

S-a demonstrat că acţiunea citotoxică caracteristică a agenţilor alchilanţi bifuncţionali se datoreşte capacităţii lor de a forma legături transversale (cross-linking) între două catene de ADN şi anume, între atomii N7 ai moleculelor de guanină. Ca urmare a procesului de alkilare, are

loc o stabilizare a helixului de ADN ale cărui catene nu se mai pot separa în vederea replicării.

Dintre principiile de reacţie ale alchilanţilor s-au dovedit în practică mai eficace :

— *principiul „structurilor transportoare"*, conform căruia selectivitatea unui compus poate fi crescută, dacă gruparea alkilantă este grefată pe un tip de moleculă implicat în metabolismul celular normal. Aceasta este conform principiului lui Ing (1943), care arată că o substanţă farmacologic activă conţine o fracţie activă şi o porţiune structurală cu rol transportor.

— *principiul „formei latente"*, conform căruia medicamentul în forma sa de administrare este inactiv, deci netoxic ; rar „in vivo" suferă transformări enzimatice care îl aduc în forma activă. Scăderea toxicităţii produsului şi creşterea reactivităţii lui trebuie să aibă loc numai în organe sau „ţesutul-ţintă".

Endoxanul (un ester fosfoamidic ciclic al nitrogen-mustardului) a reprezentat cel mai mare succes în aplicarea principiului „formei latente" de administrare sau a „formei de transport" postulat de Dreckrey în 1952. Are o reactivitate redusă, dar prezintă selectivitate pentru ţesuturile tumorale. Particularitatea endoxanului este că devine o substanţă activă numai după ce a fost metabolizat de ficat. Doza minimă eficace a endoxanului este de numai 3% din doza minimă letală pe tumori experimentale. Cyclofosfamida se activează în prezenţa fosfamidelor care se găsesc în cantitate mare în ţesutul canceros şi în prezenţa fosfatazelor care sînt prezente în leucocite şi produce astfel un efect citotoxic mărit. Asupra cromozomilor îşi manifestă efectul producînd poliploidii şi endoreduplicaţii în proporţie de 15%. Cele mai spectaculoase rezultate s-au obţinut pe tumora Burkitt.

În clinică produsul este larg folosit, iar procentul de remisiuni de lungă durată, depăşind 7 ani, este de 20—40% din bolnavii aflaţi în ultimul stadiu. Endoxanul este folosit în tratamentul cancerului bronhial avansat. În urma tratamentului celulele canceroase din spută prezentau vacuolizări citoplasmatice perinucleare multiloculare şi nucleoli măriţi. Endoxanul s-a dovedit a fi şi un imunosupresor puternic.

Alkirom = IOB_{82} [acid 3-N, N-bis (2 cloretil) amino-4-metil benzoic] este un agent alkilant bifuncţional derivat al nitrogen-mustardului obţinut la Institutul Oncologic Bucureşti.

Tipul de leziuni ultramicroscopice determinate de IOB_{82} seamănă cu cele produse de Endoxan, dar apar mult mai devreme (după 3 zile) în cazul IOB_{82}, deoarece nu necesită o activare în ficat ca în cazul Endoxanului. Modificările intracelulare faţă de martor constau în volumul crescut al nucleului şi nucleolului ; citoplasma este săracă în organite celulare, are puţine mitocondrii cu matrice clară şi cîteva criste. Ribozomii sînt liberi în citoplasmă şi neasociaţi cu reticulul endoplasmatic.

TEM-ul este un alchilant polifuncţional care, acţionînd asupra moleculei de ADN, produce „cross-link"-uri. TEM-ul a fost folosit în cazul cancerului ovarian şi a produs apariţia de celule poliploide printre celulele hiperdiploide care erau existente în tumoră. Celulele poliploide au fost eliminate, ceea ce a dus la reducerea tumorii.

Scanned with OKEN Scanner

Tio-Tepa este o substanţă larg folosită în clinică, bine tolerată şi un foarte bun antitumoral. Se produce şi în ţara noastră sub numele de „Girostan" şi este utilizat mai mult în cancerul de sîn. Este solubil în grăsimi şi, asimilîndu-se în ţesuturi, se transformă în „Tepa".

Trenimonul induce necroza fără vacuolizare (necroză prin lichefiere) asupra celulelor tumorale.

Compuşii monofuncţionali prezintă un interes teoretic deosebit, deoarece presupun un mecanism de acţiune diferit, poate cu implicaţii imune. Monoclor-etilamino-derivatul monofuranozidei XVIII prezintă o activitate ridicată în leucemia experimentală L 1210, iar unii dinitroderivaţi aromatici prezintă proprietăţi farmacologice neobişnuite. De exemplu, compusul XIX, R = H are un indice terapeutic comparabil cu al azotiperitelor de uz clinic. Compusul XIX, R = $CONH_2$ prezintă cel mai ridicat indice terapeutic cunoscut, cu o toxicitate mai mică şi de alt tip decît al alchilanţilor clasici, dar numai pe carcinosarcomul experimental Walker 256.

Antimetaboliţii antitumorali. Îşi exercită activitatea de falsă represie sau inhibiţie pe căi diferite, în funcţie de procesul metabolic în care se infiltrează pînă în faza de blocare.

Antimetaboliţii antitumorali au fost în general proiectaţi pe principiul căutării unor analogi ai metaboliţilor implicaţi în sinteza „de novo" a acizilor nucleici sau a bazelor purinice şi pirimidinice.

O clasă relativ nouă de compuşi cu potenţială acţiune citostatică este cea a *inhibitorilor enzimatici ireversibili;* se urmăreşte blocarea centrilor activi ai enzimelor, paralel cu găsirea „enzimelor cheie" ale celulelor canceroase ; metoda ar fi o cale teoretic promiţătoare.

Acidul folic a fost sintetizat în 1946, iar primele observaţii au arătat că are acţiune inhibitoare în sarcomul 180.

F a r b e r a obţinut un antagonist al acidului folic, *Aminopterina,* care a fost eficace în leucemia acută de la copii.

S-a mai obţinut *Ametopterina* (MTX) care, fiind mai puţin toxică şi cu un index terapeutic mai bun, este foarte mult folosită în clinică. MTX este foarte activ în hematoblastozele acute şi cu un efect de selectivitate asupra corioepiteliomului, fapt ce a încurajat mult perspectivele în sinteza chimioterapicelor anticanceroase ; este în ultimul timp des întrebuinţat şi în terapia altor tumori solide, în special în scheme diferite de polichimioterapie. Mecanismul său de acţiune se bazează pe formarea unui complex de mare stabilitate cu dehidrofolat-reductaza, care se mai regăseşte în unele ţesuturi la 8 luni după administrarea MTX. Enzima are pentru MTX o afinitate de 100 000 ori mai mare decît pentru acidul folic.

Mercaptopurina a fost sintetizată prin analogie cu hipoxantina. Proprietăţile sale antimetabolice şi antineoplazice au fost descoperite cînd acţiunea acidului inozinic asupra purinelor nu era cunoscută. Prin descoperirea importanţei hipoxantinei s-au făcut studii amănunţite privind relaţiile structură-activitate antitumorale, dar compuşii obţinuţi nu aveau o activitate imunorepresoare. Pe baza aceluiaşi principiu, 6-mercaptopurina (*Purinetol*) a putut fi transformată în 9-d-ribofuranosidă, ceea ce a dus la creşterea de 7 ori a indicelui terapeutic.

Scanned with OKEN Scanner

S-au obținut alte variante ale modificării purinelor naturale, compuși care se încorporează în acizii nucleici, dar nu s-au obținut rezultate clinice satisfăcătoare (de exemplu, *Hipoxantina, Cloropurina).*

Timina, una din bazele pirimidinice ale ADN-ului, se formează în celule din uracil, prin introducerea în poziția 5 a unei grupări metil cu ajutorul timidilat-sintetazei, coenzima fiind acidul tetrahidrofolic. Fluoropirimidinele au fost proiectate în ideea blocării poziției 5. Apoi a fost sintetizat un număr foarte mare de derivați de acest tip, inclusiv 5-fluorocitozina și acidul 5-fluoroorotic (acidul orotic, deși nu apare în ADN sau ARN, este principalul precursor al pirimidinelor acizilor nucleici), precum și 5-fluoro-6-azaderivați, dar nici unul nu a oferit avantaje terapeutice ca *5-fluorouracilul,* astăzi foarte larg răspîndit. Studiul metabolismului acestei substanțe a condus la prepararea a două nucleozide : *5-fluorouridina* (FUR) și *5-fluorodeoxiuridina* (FUDR), ca forme de transport ale antimetabolitului inițial, ceea ce a dus la o scădere a efectelor toxice și la creșterea indicelui terapeutic.

Studii citologice au arătat că după expunerea celulelor între 0 și 8 ore la FUDR și ADR nu se observă schimburi cromatidiene. Faptul că ele acționează asupra ciclului celular în perioada de sinteză se reliefează prin apariția de „gap"-uri și „break"-uri pe cromozomi. Uneori se observă o supresare totală a mitozei la 10 ore de la administrare.

6-aza-timina, și în special *6-aza-uracilul,* au prezentat activități ridicate pe tumori experimentale însoțite însă de o toxicitate foarte accentuată. Un progres însemnat a fost obținerea nucleozidelor corespunzătoare bazelor pirimidinice : *6-aza-uridina* și *5-aza-citidina,* care au intrat în stadiul de testare clinică.

5-aza-citidina nu are efect imediat asupra sintezei ADN-ului. Totuși, limfocitele expuse mai mult de 3 ore suferă o inhibiție a încorporării ^{3}HTdR, cu o inhibiție mai marcată a fosforilării timidinei. Inducerea ADN-polimerazei (care de obicei se produce în mod normal după adăugarea de PHA-M[1] la limfocitele de cal) este complet inhibată după incubare cu 5-aza-citidina. După incubarea cu aza-citidină (1×10^{-5}M), 4—6 ore de la adăugarea PHA-M, sinteza de ARN se inhibă complet, iar sinteza proteică se instalează chiar în primele 50 de minute. Ca un analog sau precursor normal al ARN, s-a sugerat că 5-aza-citidina exercită efectul său după încorporarea ei în ARN.

Antibioticele. Acestea sînt citostatice care, după formula moleculară, pot să acționeze fie după modelul alchilanților, fie ca antimetaboliți, fie mixt (alchilant și antimetabolit).

În terapia tumorilor au fost încercate toate antibioticele și s-a constatat că unele dintre ele sînt active pe tumori experimentale care au fost rezistente la alchilanții sau metaboliții cunoscuți.

Dintre primele antibiotice izolate (penicilina, streptomicina, tetraciclina etc.), cloramfenicolul prezintă interesante posibilități hidrostatice.

Cloramfenicolul are efect inhibitor asupra sintezei proteice, care se face în faza G_1 a ciclului celular.

---

[1] PHA — fitohemaglutinină.

Scanned with OKEN Scanner

Streptomicina acţionează atît în sisteme acelulare cît şi în celulele vii, favorizînd producerea de „erori" la traducerea codului genetic. Ea generează acest efect prin combinarea cu ribozomii, perturbînd astfel interacţiunile normale ale *m*-ARN—*t*-ARN—ribozomi. Frecvenţa erorilor de citire a diferit astfel : cînd streptomicina a fost adăugată unor celule streptomicinosensibile, s-au produs „erori" pe scară mare ; asupra celulelor streptomicinorezistente a acţionat producînd erori mult mai rar, dar suficient de frecvente pentru a determina supresia unui număr de mutaţii ca urmare a provocării sintezei unor mici cantităţi de molecule active ale enzimelor implicate în sintezele respective. Cu timpul s-a constatat că erorile de citire provocate de streptomicină nu se produc la voia întîmplării. În cazul în care se utilizează drept matriţă poli-U, în prezenţa unor ribozomi sensibili, cea mai frecventă eroare este înlocuirea fenilalaninei (UUU) prin izoleucină (AUU). Aceasta sugerează că prezenţa streptomicinei nu afectează în mod normal decît poziţia unuia din cei 3 nucleotizi ai codonului (UUU).

Adriamicina este un antimitotic şi citotoxic care se foloseşte în tratamentul leucemiei cronice şi acute ; s-au obţinut regresii tumorale în limfoame, sarcoame ale ţesuturilor moi, neuroblastoame, cancer de sîn şi pulmon.

Daunomicina, un antibiotic din grupul rodomicinei, se metabolizează în ficat şi, parţial, în rinichi. Timpul de înjumătăţire este bifazic : o dată la 45 minute şi apoi la 55 ore, ceea ce permite o puternică interferare în timp, cu sinteza ADN şi ARN. Aceasta explică leziunile pe principalele ţesuturi în proliferare şi, în plus, pe cele renale ; este toxică pentru miocard.

Bleomicina. Celulele sincronizate cu limfom uman şi tratate cu bleomicină prezintă reactivitate crescută în faza G_2 a ciclului celular. Acelaşi efect s-a observat la tratamentul cu 1,3-bis (2 cloroetyl)—1-nitrozouree. Un anumit tip de celule (suşe) au supravieţuit în toate fazele ciclului celular, sugerînd că leziunile moleculare pot fi acumulate înainte de moartea celulei, chiar în stadiul sensibil. Antibioticul se distribuie în toate organele dar mai ales în piele şi pulmon. De aceea, se foloseşte pentru cancerele de piele (carcinom spinocelular).

Streptonigrina acţionează asupra limfocitelor umane cultivate producînd la nivel citogenetic endoreduplicaţii şi poliploidii în proporţie de 11% şi leziuni cromozomale de tip „break", cromozomi dicentrici şi, deci, inhibiţia mitozelor. Este recunoscută şi ca un inhibitor al sintezei proteice.

Azaserina este un antibiotic al sintezei ADN şi a precursorilor ADN-ului. Este un puternic inhibitor al mitozei la plante şi animale (T a n a k a şi S u g i m u r a — 1950). Studii biochimice au arătat că azaserina este un puternic inhibitor al reacţiilor solicitînd glutamină ca amino-donator. Inhibiţia mitotică indusă prin azaserină este în general considerată a fi un rezultat al acţiunii inhibitoare a azaserinei asupra biosintezei proteice. Inhibiţia mitotică produsă prin azaserină este contracarată de purinele preformate şi de carboxamida aminoimidazolică. Totuşi, dacă inhibiţia biosintezei purinelor este numai o cauză a inhibiţiei mitotice, produsă de azaserină, este dificil să se constate de ce aminoacizii, ca şi fenilalanina şi triptofanul, sînt capabili să anuleze inhibiţia mitotică.

Scanned with OKEN Scanner

Actinomicina-D a fost izolată inițial din culturi de *Streptomyces*. Inhibitor puternic al transcripției ARN, antibioticul formează complexe cu ADN, dar nu cu ARN. Deoarece diviziunea celulară este aparent inhibată de concentrații sub cele cerute de inhibiția sintezei de ADN, creșterea inhibiției obținută prin tratamente cu actinomicină-D pare a fi mai degrabă rezultatul supresării sintezei ARN și proteinelor, decît o inhibiție a sintezei ADN-ului. Antibioticul acționează mai puternic asupra celulelor proliferative, care sînt în general mai sensibile decît cele neproliferative. Este folosit în rabdomiosarcoame embrionale. Actinomicina-D nu are nici un efect asupra reproducerii multor altor virusuri cu ARN ca, de exemplu, virusul poliomielitic, a căror replicare se realizează prin intermediul unui ARN dublu-helicoidal. Se distribuie rapid în toate organele ; ficatul se degajă repede, însă antibioticul se menține mai mult timp în timus și splină, care suferă o puternică citotoxicitate.

Mitomicina-C este un complex care reunește trei funcțiuni reactive : aziridinil, chinonă și carbamoil, avînd efect alkilant datorită faptului că leagă împreună lanțurile de ADN prin legături covalente (Iyer și Szbalski — 1963). Este un puternic inhibitor al diviziunii și sintezei ADN, fără să influențeze sinteza proteinelor și a ARN-ului.

Mitomicina-C adăugată în culturi de fibroblaști de șoarece L-929 și melanom de șoarece S-91 a determinat formarea de celule gigant, care conțineau picături de ADN în citoplasmă și depolimerizarea ADN-ului nuclear.

Efectul Mitomicinei-C (0,0001% pe oră) la leucocite umane „in vitro" a fost studiat de Nowell (1964). Celulele tratate în faza G_0 (mitotic inactive) au fost inhibate în dezvoltarea lor la prima mitoză. Celulele tratate în G_2 sau în interfaze nu au suferit inhibiție mitotică. A mai fost obținută inhibiția mitotică cînd tratamentul s-a dat în faza G_1 sau în *S*.

Mitomicina C se distribuie în țesuturi și tumori în raport de doză. Eritrocitele absorb drogul și îl inactivează.

Alcaloizii. Extractele de origine vegetală cu tradiție în farmacopee au fost testate și pe tumori. Efectul substanțelor înglobate în această grupă se exercită asupra celulelor în timpul mitozei, ceea ce prezintă avantajul blocării celulelor în metafază.

Colchicina a fost extrasă din *Colchicum autumnale* și a căpătat o utilizare terapeutică mult mai mare sub denumirea de *Demelococină*, toxicitatea acesteia fiind redusă de 30 de ori. Ea inhibă asamblarea tubulinei în fibrele fusoriale, legîndu-se de *m*-ARN-ul tubulinei.

Podofilina, extrasă din *Podophyllum peltatum*, a fost folosită în secolul XIX ca purgativ. După descoperirea proprietăților sale antimitotice a căpătat aplicații (restrînse) în tratamentul local. Se găsește sub forma produșilor : *Proresid, SP-I, SP-G*. Prin marcarea lor cu substanțe radioactive s-a constatat că se elimină mai greu, în urma tratamentului, din tumoră, ficat și aparatul gastrointestinal (3 zile).

Asupra celulelor produce modificări ale citoplasmei în care se observă vacuolizări perinucleare și ale nucleului, unde se formează vacuole. Nucleul crește și se umple cu granule și cromatină, grosiere.

Scanned with OKEN Scanner

Vinblastina și *Vincristina (Oncovin)* s-a extras din *Vinca rosea* și au produs remisiuni de lungă durată în limfogranulomatoză. În cursul studierii acțiunii lor hipoglicemice a fost descoperită și activitatea lor antileucemică. Și ele au o acțiune antifusorială, împiedicînd alungirea fibrelor fusoriale.

Acronicina s-a obținut din *Acronicia baueri.* Ea s-a dovedit a fi foarte activă în leucemia experimentală C-1498, care este rezistentă la produsele utilizate în prezent.

Noua metodă de polichimioterapie folosește vincristina și vinblastina ca citostatice care, blocînd celulele în metafază, oferă posibilitatea celorlalte citostatice să acționeze în faza *S* sau G_2, reușind să distrugă un număr tot mai mare de celule surprinse în această fază.

Hormonii. Importanța hormonilor în inducerea și controlul creșterii țesuturilor maligne este unanim recunoscută. Mecanismul lor de acțiune este mai puțin cunoscut, dar se bazează pe o înaltă specificitate structurală, presupunînd deci receptori celulari de același tip.

T. Beatson (1969) a sugerat că ovarectomia ar putea avea un efect favorabil asupra carcinoamelor mamare inoperabile, sugerînd astfel o terapeutică hormonală.

Hormonii au fost folosiți astfel în cazul tumorilor hormonodependente sau al aparatului hormonal. *Corticosteroizii* (cortizonul, hidrocortizonul, prednisonul, prednisolonul, derivații floruraţi) și *ACTH*-ul au fost aplicați în unele forme de leucemii. *Tiroxina* a fost utilizată în tumori ale tiroidei, dar cele mai importante utilizări le-au căpătat hormonii sexuali naturali sau sintetici.

Dintre androgeni, cele mai bune rezultate s-au obținut cu *propionatul de testosteron* în tratamentul cancerului de sîn.

Proliferarea țesuturilor neoplazice nu se sustrage nici ea complet de sub influența reglatoare a sistemului neuroendocrin, iar așa-zisa „autonomie" a tumorilor maligne este mai mult aparentă decît reală. De fapt creșterea tumorii și extinderea ei invazivă în organism este condiționată de raportul de forțe dintre „virulența" celulei canceroase și capacitatea de rezistență a organismului, în diferitele momente ale unui proces mai mult sau mai puțin îndelungat, desfășurat în etape succesive.

Între factorii de organism care intervin în acest proces, un rol important revine hormonilor, ceea ce a determinat apariția unei noi metode de combatere a tumorilor maligne : *hormonoterapia.*

În 1967, Ch. Huggins a primit Premiul Nobel pentru medicină deoarece, încă din 1941, a sesizat primul că „autonomia cancerului acceptată pînă atunci era o eroare conceptuală".

Hormonii *citostatici* constituie o nouă clasă de substanțe de sinteză cu acțiune anticanceroasă potențială, obținută prin grefarea de grupări citostatice pe hormoni.

Mecanismul lor de acțiune este mai puțin clar, dar se bazează pe o înaltă specificitate structurală, presupunînd deci receptori celulari de același tip.

J. Danielli (1954), urmărind activitatea citostatică a *uretanului,* a observat inactivarea sa în țesutul neoplazic, ca urmare a hidrolizei produsă de enzima carbamidază.

Scanned with OKEN Scanner

În intenția de a folosi o legătură labilă între hormon și gruparea citostatică, Șt. M. Milcu, H. Zimel (1960) au preconizat sinteza unor *derivați carbamidați* hormono-citostatici. Dată fiind distribuția preferențială a carbamidazei în tumori, s-a presupus că puntea carbamidică va fi desfășurată selectiv la acest nivel, punînd în libertate grupările hormonale și citostatice în forme active.

C. D. Nenițescu (1962) a sintetizat unii derivați carbamidici azotiperitați de : hexestrol, stilbestrol, testosteron, cortizon și tiroxină. Avantajul acestor substanțe este că azotiperita nu-și manifestă efectele toxice și activitatea hormonală rămîne specifică.

De asemenea, screeningul efectului antiblastic pe tumori experimentale a arătat existența unei activități variabile în raport cu tipul de tumoră și cu sexul animalelor.

Pînă în prezent cele mai bune rezultate le-a dat derivatul carbamidic azotiperitat de stilbestrol denumit „Stilbostat" în tratamentul cancerului de prostată. Cu acest preparat s-au obținut rezultate bune în cazuri neoperabile, în cazuri de bolnavi refractari la alte tratamente. Stilbostatul s-a folosit și în cancerul mamar și s-a observat reducerea în volum a tumorii și a adenopatiei satelite în 70% de cazuri, remisiunea obținută putînd fi prelungită apreciabil prin administrarea unui tratament de întreținere.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10

CICLUL CELULAR

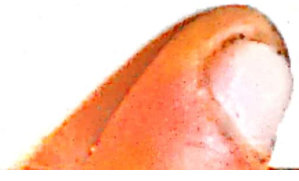
Celulele, luate individual, au o anumită durată de viaţă în decursul căreia îmbătrînesc şi, în final, mor. Se consideră că atît limitarea capacităţii de creştere, cît şi durata limitată a vieţii celulare sînt principalii factori fiziologici care determină moartea celulelor. O experienţă iniţiată de M. Hartmann (1928) pe *Amoeba proteus* sugerează posibilitatea prelungirii „à la long" a vieţii celulare. Păstrîndu-se nucleul intact, amiba poate regenera porţiunea de citoplasmă amputată. După completa sa refacere, se taie o altă parte din citoplasmă şi se aşteaptă o nouă regenerare ; secţionările pot fi repetate la nesfîrşit. Pierderea unei părţi din citoplasmă, după un anumit timp necesar înlocuirii sale, asigură, după M. Hartmann, o durată „infinită" vieţii celulei.

Dar nu toate celulele sînt capabile să suporte această operaţie de „merotomie", adică să li se elimine o parte din citoplasmă şi apoi s-o refacă. Toate celulele însă au un mecanism adiţional prin care îşi prelungesc un timp mai îndelungat existenţa vie, fără apariţia „cadavrelor" de celule. Acest mecanism este reprezentat de *diviziunea celulară* (sau mitoză). Astfel, cînd celulele ajung la o anumită mărime specifică, ele se divid în două celule-fiice cu aceeaşi structură ca a celulei parentale. Controlul mitozei este atît de riguros, încît toate componentele celulare sînt distribuite în mod egal în cele două celule-fiice. Ceea ce a frapat de la început, cînd W. Flemming (1882) a descoperit mitoza, au fost aspectele nucleului sau cariokineza, în cadrul căreia se distribuie exact acelaşi număr de cromozomi în cele două celule-fiice.

Mitoza asigură, deci, continuitatea materialului genetic din celule de-a lungul generaţiilor fie că este vorba de zigotul care, prin diviziuni succesive va da naştere unui embrion, fie că avem de-a face cu creşterea primordiilor de organe, a organelor înseşi sau cu regenerarea lor reparatorie.

A. Howard şi S. Pelc, folosind ^{32}P, au observat pe autohistoradiografii încorporarea acestuia în ADN în perioada dintre două diviziuni celulare, adică în interfază. Dealtfel, măsurătorile de absorbţie a rad. UV şi histofotometria reacţiei Feulgen arată o dublare a cantităţii de ADN în interfază. Eucariotele prezintă o anumită perioadă în cadrul ciclului vieţii lor cînd se sintetizează ADN şi, deci, se replică materialul genetic.

Folosirea timidinei tritiate pentru prima dată de către L. Hughes (1958) a arătat că aceasta se încorporează în ADN în cursul sintezei aci-



Scanned with OKEN Scanner

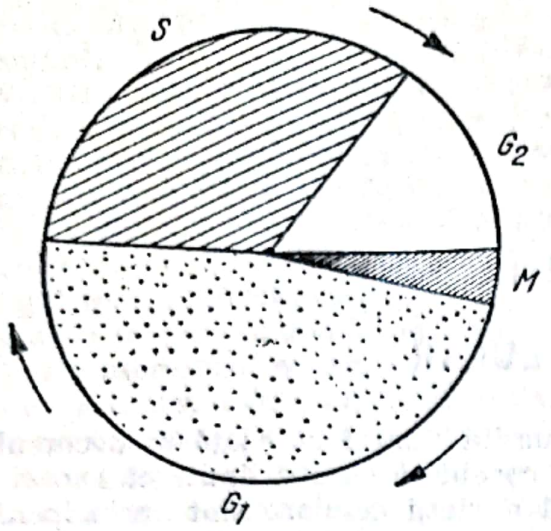


Fig. 125. Diagrama ciclului celular al unei populații în creșterea exponențială.
La un moment dat o mică parte din celule este în mitoză (*M*), în timp ce celulele din interfază sînt fiecare în intervalul presintezei (G_1), în perioada de sinteză a ADN (*S*) sau în intervalul de postsinteză (G_2) (după Howard și Pelc).

dului timidilic și a acidului dezoxiuridilic, chiar la mijlocul interfazei. Această perioadă de sinteză a ADN a fost denumită *S*. Partea de la începutul interfazei a fost desemnată ca perioadă G_1, iar cea de la sfîrșit ca G_2 (fig. 125).

10.1. MĂSURAREA CICLULUI CELULAR

V. Monesi (1967) a determinat cu multă precizie durata perioadelor *S*, G_1, G_2, ca și fazele mitozei. A incubat un timp scurt (15 minute), într-un mediu cu ^{3}H-timidină, culturi (omogene și asincrone în creștere logaritmică) de populații celulare de hamster. Apoi a spălat și reincubat culturile în mediu neradioactiv, confecționînd autohistoradiografii, la intervale regulate de timp. În timpul incubației cu precursorul radioactiv ^{3}H-timidină, numai celulele în faza *S*, care sintetizează ADN, încorporează timidina și astfel ele devin marcate.

V. Monesi consideră că în populațiile celulare omogene și asincrone, în creștere exponențială, proporția celulelor marcate în cazul unui tratament scurt cu timidină radioactivă reprezintă expresia fracției ciclului celular la care se sintetizează ADN. După incubarea într-un mediu neradioactiv, celulele marcate trec prin G_2 și apoi reintră în mitoză (*M*). În timp de cîteva ore apar din ce în ce mai multe metafaze marcate, ajungîndu-se la un moment dat ca 100% din metafaze să fie marcate. Intervalul de timp scurs între începutul marcării (timpul 0) și pînă cînd 50% din metafaze sînt marcate reprezintă durata fazei *S*, inclusiv stadiile de profază și de metafază. Celulele marcate, care sînt în intervalele de timp de la începutul fazei de sinteză, în momentul marcării trec spre metafază și apoi numărul lor scade spre zero, după cum celulele nemarcate în G_1 ajung în stadiul de metafază. Întrucît celulele marcate continuă printr-un ciclu celular următor cu a doua metafază (după marcare inițială), apare o a doua creștere a frecvenței metafazelor marcate. Media timpului în care se desfășoară fazele G_1+S+G_2+M este calculată ca intervalul dintre punctele de 50% a două curbe ascendente succesive. Intervalul dintre

Scanned with OKEN Scanner

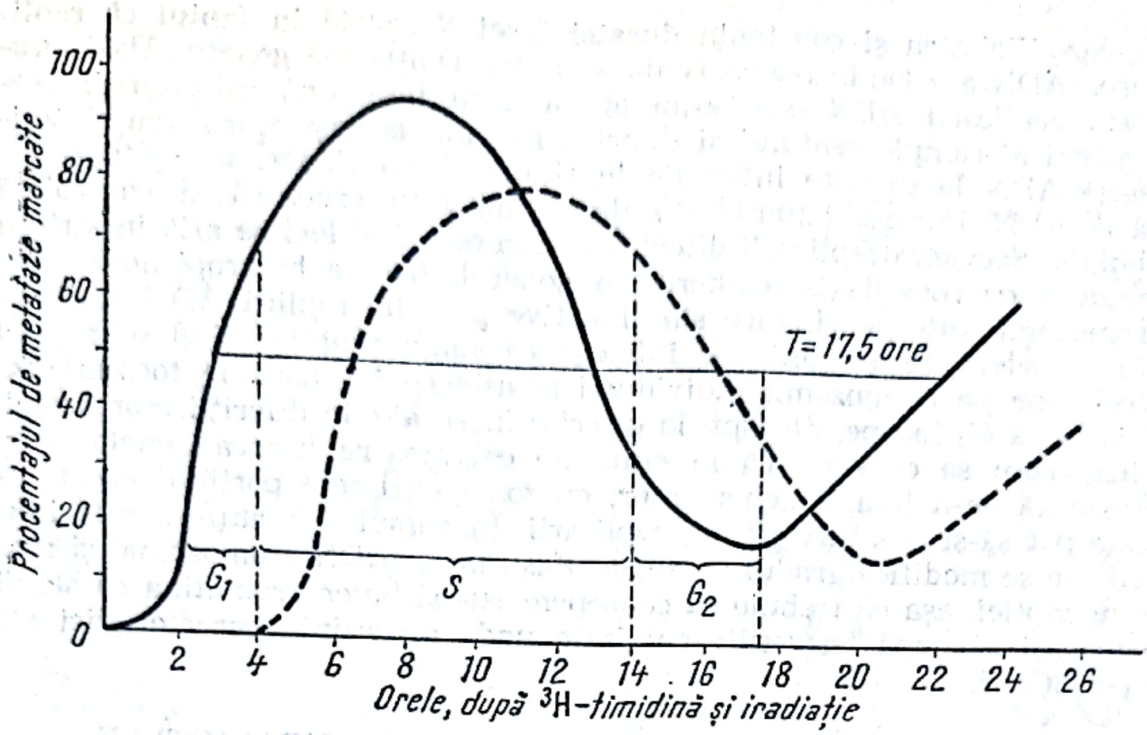


Fig. 126. Frecvența metafazelor marcate, la diferite intervale de timp și după 15 minute incubate cu ^{3}H-timidină, la populații de celule de hamster în cultură asincronă.

Linia continuă reprezintă cultura de control, iar *linia întreruptă* cea iradiată cu 250 r raze X, după marcaj. În populațiile neiradiate media parametrului-timp a ciclului celular este următoarea :

G_1, incluzînd anafaza și telofaza, este de circa 4,5 ore, S de circa 10 ore, iar G_2, pînă la metafază, de 3 ore. Iradierea cu 250 r a produs o întîrziere mitotică reversibilă în G_2 a desfășurării ciclului, de circa 3 ore, cu o mărire a fazei G_2 de la 3 la 6 ore (după V. Monesi).

punctele de 50% de pe curba (de frecvență a metafazelor marcate) ascendentă și descendentă dă durata fazei S. Scăzînd valoarea S a două intervale G_2 din valoarea totală, rezultă media duratei fazei G_1 (fig. 126).

La multe tipuri de celule durata sintezei ADN este între 6—10 ore, în multe cazuri fiind de 7—8 ore, iar faza G_2 de 2—5 ore. De pildă, două linii celulare de hamster auriu ($2n = 22$ și $4n = 44$) au următorul ciclu celular : $G_1 = 4{,}5$ ore, $G_2 = 3$ ore și $S = 8$ ore. De regulă, durata fazelor S și G_2 sînt constante. Modificarea fazei S rezultă din procesul diferențierii celulare. F. Bresciani (1974) a observat că durata fazei de sinteză a ADN în celulele alveolare din glanda mamară a șoarecelui care, în condiții normale, variază între 14,8—27,6 ore (în medie 20 h), scade la 9,5—11,9 ore după un tratament de 3—4 zile cu hormoni steroizi de tipul progesteron și 17-β-estradiol.

V. Monesi (1962), observînd evoluția liniei seminale mascule la șoarece începînd de la tipul spermatogonie inițială *A-I* la spermatogonia matură de tipul *B*, a constatat o mărire a fazei S de la 7 la 14,5 ore, paralelă cu o scădere a fazei G_2 și a profazei de la 14 la 4,5 ore. Întreaga durată a ciclului celular este de 27—30,5 ore, iar a fazei G_1 de 6,5—9,5 ore și rămîne constantă. Creșterea fazei S se explică prin condensarea progresivă a cromozomilor.

Scanned with OKEN Scanner

Specificitatea și constanța duratei fazei *S* constă în faptul că replicarea ADN are loc într-o secvență anumită, controlată genetic. Dacă procesul replicării ADN este asincron, aceasta înseamnă că diferiții cromozomi ai complementului și diferiții loci din același cromozom sintetizează ADN la diferite intervale în timpul fazei *S*. Or, secvența replicării ADN într-un anumit tip de celulă este specifică și controlată genetic. Secvența replicării diferiților cromozomi și loci se află în strînsă legătură cu constituția acestora. În general, părțile heteropicnotice din cromozomii interfazici, care sînt inactive genetic, replică ADN mai tîrziu ca celelelate regiuni. Se înțelege că suma timpilor cînd se replică „locii" de pe cromozomii individuali și asincroni constituie tocmai faza *S* iar faza G_2 începe, de fapt, la diferite intervale, la diferiții cromozomi. Pînă acum se constata că în culturile celulare replicarea genelor este constantă de-a lungul generațiilor, cu toate că unele porțiuni cromozomale pot să-și modifice ritmul replicării. În cursul diferențierii este limpede că se modifică gradul de superînfășurare a ADN cromozomal și rata transcripției, așa că trebuie să concepem eu- și heterocromatina ca stadii care variază după țesuturile analizate unde reprezintă caracteristici ale diferențierii.

10.2. REPLICAREA CROMOZOMILOR LA EUCARIOTELE SUPERIOARE

Fenomenul a fost studiat de J. Taylor mai întîi pe plantule de *Vicia faba* și apoi pe *Bellevalia romana, Crepis capillaris, Allium cepa, Tradescantia paludosa,* celule de la linii de hamster și de la om, la *Potorus tridactylus* etc. Plantulele au fost introduse în soluții de timidină tritiată, care pătrund prin rădăcini și se încorporează în ADN-ul nucleilor meristematici din vîrful vegetativ. S-a lăsat un timp necesar replicării cromozomilor, după care plantulele au fost spălate și transferate în mediu de cultură fără timidină. Printr-un tratament cu colcemidă s-au blocat diviziunile în metafază, fără ca să fie afectată sinteza ADN și duplicarea cromozomilor.

Cu un astfel de procedeu s-a putut urmări distribuția marcajului radioactiv de-a lungul mai multor generații de cromozomi proveniți din aceeași celulă inițială. Cînd replicarea cromozomilor a avut loc în prezența timidinei tritiate, cele două cromatide ale fiecărei perechi de cromozomi au apărut marcate. După o a doua duplicare în absența izotopului, s-a observat cum un cromozom-frate a fost marcat, iar celălalt nu. Cu alte cuvinte, cromozomul marcat a dat naștere la doi cromozomi, dintre care unul marcat și celălalt nu (fig. 127).

Această constatare este sprijinită de ipoteza constituirii cromozomilor din două subunități de ADN. Cînd iau naștere cromozomii-fii, subunitățile se separă și fiecare din ele se dedublează. Dacă aceasta are loc în prezența timidinei marcate, atunci cei doi cromozomi care rezultă devin marcați. După o a doua replicare, în absența marcajului va rezulta un cromozom marcat și altul nu.

Taylor a mai injectat timidină tritiată la lăcusta *Romalea microptera*, după care a făcut din timp în timp frotiuri din testicule pentru a surprinde încorporarea izotopului în cursul spermatogenezei. El a găsit

Scanned with OKEN Scanner

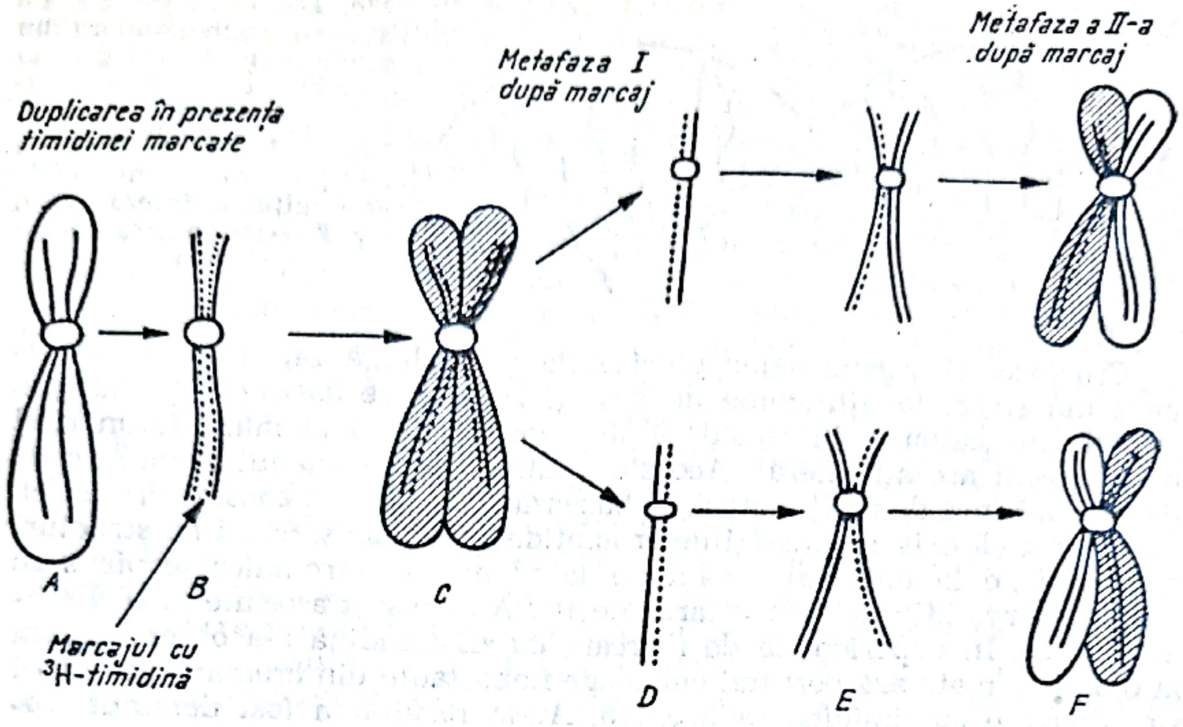


Fig. 127. Duplicarea cromozomilor în mitoză :
A — cromozomul și duplexul ADN nemarcat ; *B* — molecula de ADN după duplicarea în prezența timidinei tritiate ; catenele neoformate marcate sînt punctate ; *C* — cromozomul marcat în cele două cromotide ; *D* — separarea cromatidelor precedente ; *E* — moleculele precedente după duplicarea în mediul radioactiv ; una din molecule este marcată, cealaltă nu ; *F* — cromozomul corespunzător imaginii precedente ; una din cromatide este marcată, cealaltă nu (după L. Levine).

o distribuție identică cu aceea din mitoză. Duplicarea meiotică a ADN cromozomal se produce după tipul semiconservativ, ca și cea mitotică.

Replicarea ADN a mai fost studiată de Taylor și pe celule de hamster, folosind bromdeoxiuridină (^{3}H) și un inhibitor al timidilat-sintetazei, fluorodeoxiuridina. Astfel, a găsit că lanțul de ADN se replică cu o viteză de 1—2 μ/minut, formînd în mod constant unități de 1—2 μ lungime, așa încît iau naștere fibre de ADN dispuse cap la cap, în tandem, lungi de 7—30 μ.

Studii autoradiografice pe secțiuni fine de celule He Lá marcate la diferiți timpi au arătat că centrele de inițiere a replicării se găsesc pe porțiunile de cromozomi care stau atașate pe membrana nucleară. S-a presupus astfel că la cromozomii interfazici ai eucariotelor, o singură moleculă de ADN este atașată de membrana nucleară pe o porțiune de 7—60μ (fig. 128), inițierea începînd de aici și continuîndu-se în ambele direcții. Terminarea replicării ar putea să aibă loc tot pe membrana nucleului.

J. Cairns (1963) a calculat, prin experiențe autoradiografice făcute pe ADN din celulele He Lá, că duplicarea ADN are loc cu mai puțin de 0,5 μ/minut și, raportînd la lungimea unui cromozom uman, acesta reduplică în 6 ore 3 cm. Duplicarea are loc pe 100 de situsuri care funcționează simultan. Numărul unităților de replicare la aceste celule este de 15 000 și chiar mai mult.

Scanned with OKEN Scanner

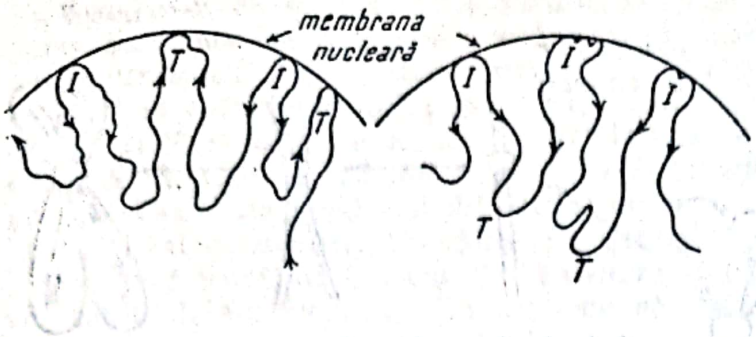


Fig. 128. Două modele ale atașării cromozomilor din celula eucariotelor la membrana nucleară interfazică.
Litera *I* indică locurile de pe cromozomi unde este inițiată sinteza ADN, iar *T* — terminarea acesteia.

Cromozomii organismelor pluricelulare, pe lîngă faptul că sînt formați din șiruri longitudinale de unități replicative așezate de-a lungul, sînt și multicatenari în sensul că sînt formați din mai mult de un rînd de repliconi așezați lateral. Această viziune a cromozomului, mai veche dar admisă încă de mulți autori, se bazează pe o serie de constatări. Astfel, se observă că există jumătăți de cromatide sau chiar sferturi de structuri cromatidiene la unii cromozomi de la plante. Electronmicroscopic s-au putut observa „fibrile elementare" de 100 Å care sînt asociate lateral cromozomilor. În experiențele de marcare cu ^{3}H-timidină s-a observat cum la o a doua metafază porțiuni omoloage importante din cromatidele-surori sînt marcate cu timidina radioactivă. Acest rezultat a fost denumit *izomarcare* și a fost explicat prin constituirea cromatidei din cel puțin două „piese" de ADN așezate lateral care, la al doilea ciclu după încorporarea izotopului, segregă, dînd o cromatidă-fiică marcată sau una izomarcată. O serie de cercetări au arătat că la sfîrșitul fazei G_1 cromozomii se despică în două cromatide înaintea sintezei ADN.

De regulă, se constată că celulele care încetează să prolifereze se opresc în faza G_1, cu excepția celulelor epidermului de șoarece și a celor apicale din rădăcinile de *Marsilia strigosa*, care rămîn în G_2. Și cum fazele S și G_2 sînt egale la celulele mamiferelor, înseamnă că dacă sinteza ADN se inițiază, ea se continuă în G_2 și cu mitoza într-o rată constantă, pînă la următorul G_1. Se consideră că o piedică în diviziune este creșterea celulară care se află plasată între G_1 și S. O serie de lucrări arată că dacă se inhibă sinteza unor proteine specifice și a ARN în G_1, atunci nu se mai inițiază replicarea ADN, respectiv mitoza.

Rolul proteinelor specifice în inițierea replicării ADN a fost evidențiat astfel :

— prin culturi sincronizate de *Tetrahymena pyriformis* lipsite de aminoacizii esențiali care să pună în imposibilitate biosinteza proteică ;

— s-au folosit inhibitori ai acestor biosinteze pe microspori de *Lilium longiflorum* ;

— tratîndu-se animale sau culturi de celule cu puromicină, actinomicină-D sau *p*-fluorofenil-alanină, s-au obținut blocările ciclului celular.

G. Stone și D. Prescott (1965—1975) identifică această proteină inițiatoare — timidin-kinază, care apare de la începutul sintezei ADN, se păstrează în toată faza S pentru ca să dispară la sfîrșitul replicării ADN. Inhibiția timidin-kinazei și ADN-polimerazei pot fi implicate în depresia biosintezei ADN, cu condiția ca celulele să nu fi fost tratate în cadrul experiențelor cu actinomicină sau puromicină. „In vitro", se observă clar cum inhibarea sintezei ADN-proteine în cursul fazei S, chiar

Scanned with OKEN Scanner

dacă nu s-a inhibat biosinteza ADN, blochează ajungerea celulei în G_2, suprimînd diviziunea celulară. Rata sintezei ARN crește continuu din G_1 prin S în G_2, pentru ca apoi să scadă brusc la zero în metafază. În alte cazuri se pot chiar surprinde două maxime de încorporare a ^{3}H-uridinei, și anume în G_1 și G_2. Acidul ribonucleic din cromozomi se sintetizează paralel cu sinteza ADN și trece în timpul prometafazei în citoplasmă.

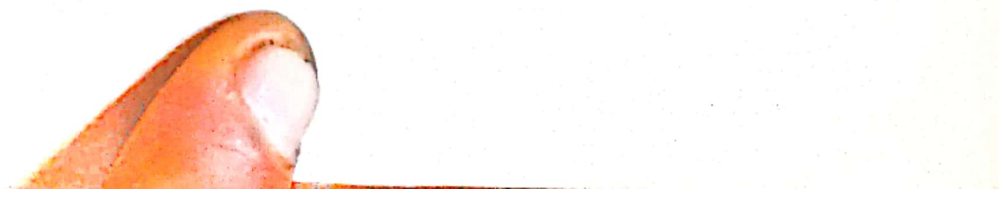
Proteinele au două maxime de biosinteză în G_1 și G_2 dar, spre deosebire de ARN, se constată o mică sinteză chiar în cursul diviziunii. În metafază are loc o dezintegrare a poliribozomilor și o creștere a ribozomilor izolați. Metafaza inhibă deci formarea ARN mesager și reglează, implicit, biosinteza proteinelor. Mai mult, cromozomii mitotici au o substanță sensibilă la tripsină, care inhibă tocmai proteosinteza. După F. Kasten și F. Strasser (1966—1975), în G_1 are loc în nucleol sinteza histonelor bogate în arginină, iar la sfîrșitul perioadei S are loc sinteza histonelor bogate în lizină care inhibă mitoza.

La *Amoeba proteus* proteinele specifice nucleului se elimină în citoplasmă în cursul mitozei și apoi se reîntorc în nucleu la sfîrșitul telofazei. O fracție dintre ele — 40% din proteinele nucleare — migrează astfel continuu între nucleu și citoplasmă, ceea ce a determinat să fie numite *proteine cu migrație rapidă* (PMR). Cealaltă fracție — 60% — nu migrează și este cunoscută ca *proteine cu mobilitate mică*. Aceste două clase de proteine sînt sintetizate în citoplasmă. Proteinele care migrează puțin sînt mai solubile în acid acetic decît acelea puternic migratoare, fiind proteine de structură ale cromozomilor care se formează în citoplasmă și trec în nucleu în faza S (tab. 11).

Tabelul 11

Compoziția și activitatea de replicare a cromatinei din diferite țesuturi

Originea cromatinei	ADN	Histone	Proteine nehistonice	ARN	Activitatea de replicare a ADN (%)
Axul embrionar de la mazăre	1	1,03	0,29	0,26	12
Vîrful vegetativ de la mazăre	1	1,30	0,10	0,11	6
Cotiledonul în creștere de la mazăre	1	0,76	0,36	0,13	32
Ficat de șobolan	1	1	0,67	0,043	20
Tumoră ascitică de șobolan	1	1,16	1	0,13	10
Celule HeLá	1	1,02	0,71	0,09	10
Timus de vițel	1	1,14	0,33	0,007	15
Blastulă de arici de mare	1	1,04	0,48	0,039	10
Pluteus de arici de mare	1	0,86	1,04	0,078	20



Scanned with OKEN Scanner

10.3. BIOSINTEZA ACIZILOR NUCLEICI

Începe prin sinteza precursorilor nucleotidici, care este comună atît pentru ADN, cît şi pentru ARN, pînă la obţinerea difosfaţilor ribonucleozidici. După aceea, ei pot fi fosforilaţi de către kinazele respective şi apoi polimerizaţi de către ARN-polimerază, luînd naştere ARN, sau vor fi reduşi sub forma unor derivaţi dezoxi- corespunzători, dintre care trei sînt fosforilaţi cu trifosfaţi : *d*-ATP, *d*-CTP, *d*-GTP. În privinţa *d*-TTP, acesta derivă din *d*-UMP printr-o serie de reacţii, cuprinzînd metilarea *d*-UMP şi *d*-TMP şi fosforilarea *d*-TMP în *d*-TTP ; *d*-UMP este format pe seama difosfatului de dezoxiuridină sau dezoxicitidină. Pe de altă parte, *d*-TTP poate proveni din TdR prin fosforilări ulterioare colaterale, care vin în ajutorul creării unei cantităţi suficiente de *d*-TTP. Cei patru trifosfaţi dezoxiribonucleozidici sînt apoi polimerizaţi în ADN datorită ADN-polimerazei (fig. 129).

Cînd, în 1953, J. Watson şi F. Crick au făcut cunoscut principiul împerecherii bazelor într-un dublu helix de ADN, s-a putut deduce din această schemă mecanismul dedublării ADN, adică al replicării sale. În cadrul acestuia, cele două lanţuri ale dublului helix de ADN servesc fiecare ca tipar pentru cîte un lanţ complementar neoformat. Biosinteza ADN a fost denumită *semiconsecutivă,* fiecare moleculă-fiică de ADN compunîndu-se din cîte un lanţ vechi şi unul nou, care refac dublul helix. Existenţa acestui mecanism a fost dovedită cu ajutorul precursorilor

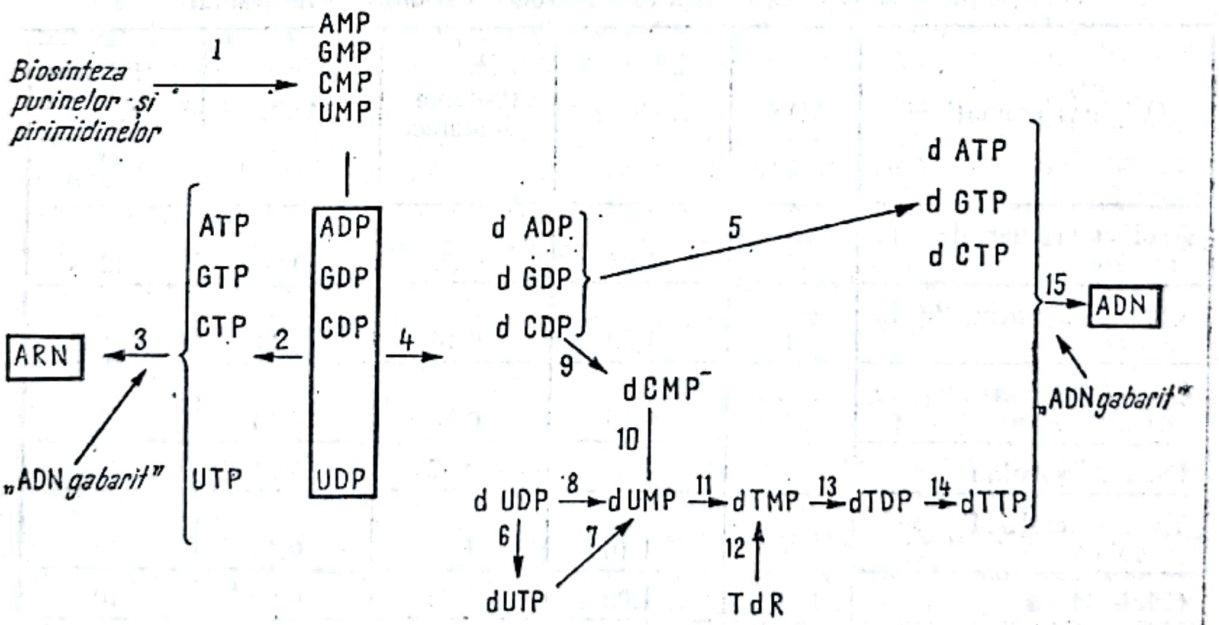


Fig. 129. Schema căilor generale de sinteză a ADN şi ARN : *1* — ribonucleozid monofosfat-kinaza ; *2* — ribonucleozid difosfat-kinaza ; *3* —ARN-polimeraza ; *4* — ribonucleozid difosfat-reductază ; *5* — dezoxiribonucleozid difosfat (*d*-ADP — *d*-GDP — *d*-CDP)-kinaze ; *7* — *d*-UTP pirofosfatază ; *8* — *d*-UDP fosfatază ; *9* — *d*-CDP-fosfatază ; *10* — *d*-CMP-desaminază ; *11* — *d*-TMP-sintetază ; *12* — Td-R-kinază ; *13* — *d*-TMP-kinază ; *14* — *d*-TDP-kinază ; *15* — ADN-polimerază (după Benita De Petrocelis şi A. Monroy).

marcaţi ai ADN. Din figura 130 apare clar prezenţa în a doua generaţie a unor molecule în care cîte un lanţ al ADN este marcat. Această situaţie are drept urmare faptul că în a treia generaţie moleculele marcate şi nemarcate sînt în proporţii egale.

Studii autoradiografice făcute pe cromozomi de mamifere şi de plante de către J. Taylor au confirmat concepţia lui Watson şi Crick. La fel şi cercetările lui J. Cairns efectuate pe ADN format dintr-un singur filament circular arată cum acesta se replică tot semiconsecutiv. Replicarea începe dintr-un punct, formîndu-se o „coadă" care creşte de-a

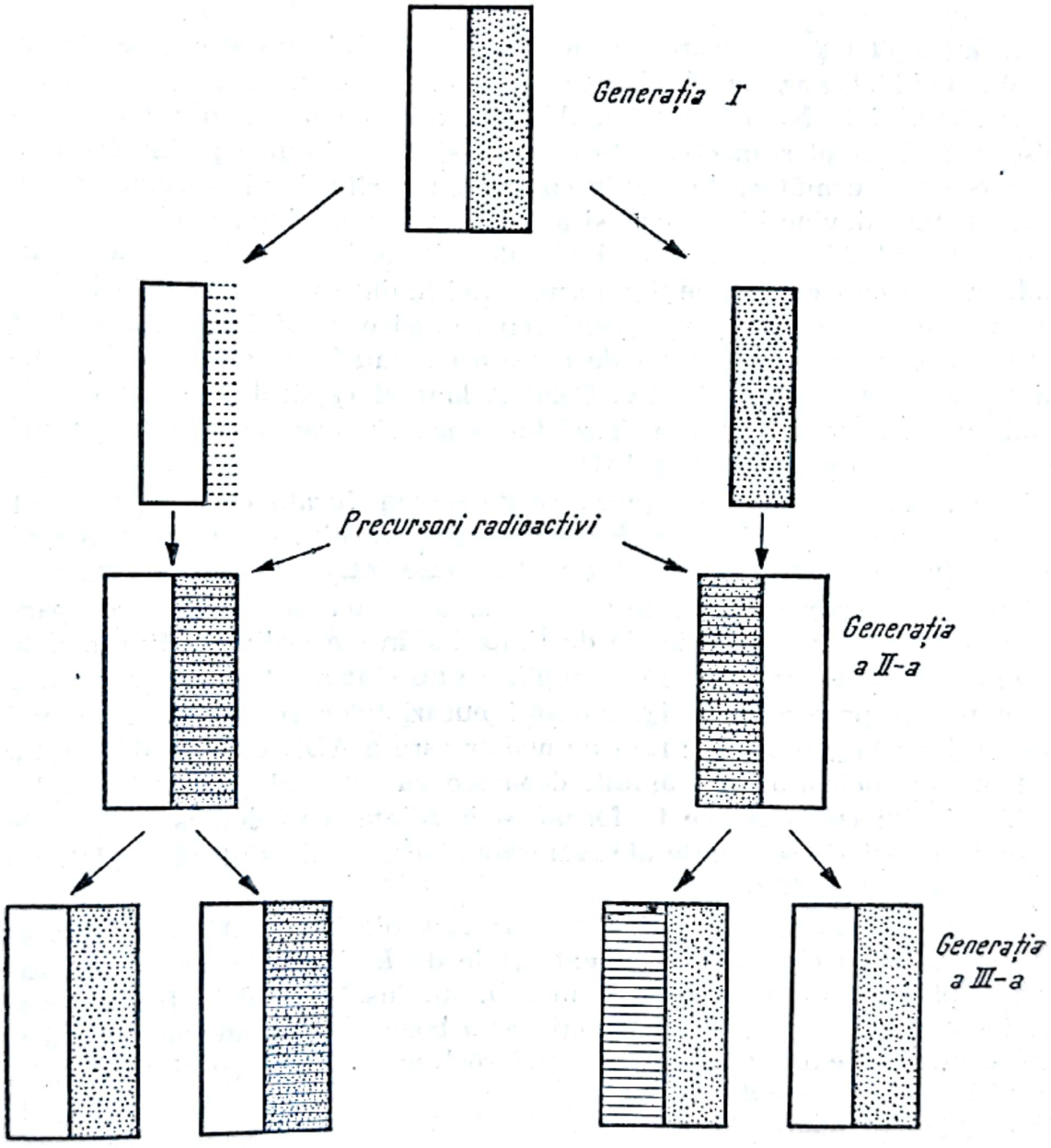


Fig. 130. Mecanismul dedublării ADN în cursul generaţiilor celulare. Introducerea precursorilor radioactivi în a 2-a generaţie a dus la molecule care conţin cîte un lanţ marcat. La următoarea dedublare a ADN, în lipsa unor precursori marcaţi, apar în a 3-a generaţie molecule marcate şi nemarcate în proporţii egale (concepţia Watson-Crick).

Scanned with OKEN Scanner

lungul ADN pînă cînd se constituie un al doilea cerc. P. Davison a analizat biochimic aceste structuri în Y închis și constată existența a patru procese ale desfășurării lor :

1) deschiderea progresivă a dublului helix ;
2) asocierea trifosfaților dezoxiribonucleotidici cu bazele încorporate într-unul sau altul din lanțurile dublului helix parental ;
3) acest dublu helix se realizează numai prin mișcarea ADN-polimerazei de la un situs la altul ;
4) o catenă, dacă nu chiar amîndouă, se învîrtesc una în jurul celeilalte.

Un alt model de replicare este acela al „cercului fără sfîrșit" elaborat de W. Gilbbert și I. Dressler. Acesta este ilustrat de cazul bacteriofagului Ø X 174 al cărui ADN se alipește de membrana bacteriei-gazdă. ADN-ul respectiv este un lanț simplu circular polinucleotidic care trece prin următoarele faze în cursul replicării sale ; la început forma monocatenară devine bicatenară și aceasta se replică după modelul semiconservativ al ADN bicatenar și circular, bacterian și mitocondrial. În final, fiecare lanț complementar format mai înainte va fi copiat la infinit și se va forma un lanț lung, identic cu „matricea" originală. Acest lanț nou se va derula și va fi tăiat de către o endonuclează specifică în unități egale cu genomul primitiv. Celălalt lanț al capătului este fixat de membrană. În același timp, o ligază formează din fragmentele de lanțuri cercuri noi, monocatenare (fig. 131).

Prin „marcarea în plus" (marcare de scurtă durată cu un precursor radioactiv) s-a precizat că neoformarea ADN pornită dintr-un punct se propagă în același timp în două direcții opuse într-o zonă definită.

Un cromozom posedă foarte multe puncte de plecare de la care apare replicarea, la intervale variabile de timp dar într-o ordine definită. Este de remarcat că aceste porțiuni de replicare nu sînt afectate de activitatea enzimatică a pronazei. La cromozomii eucariotelor replicarea este mai înceată decît la procariote : rata de neoformare a ADN este de 0,5—1,2 μ de lanț polinucleotidic pe minut, deoarece ea este micșorată de cuplarea ADN-ului cu histonele în formarea imediată a nucleohistonelor. De altfel, în diferitele segmente ale cromozomilor, rata de sinteză a ADN nu este uniformă (fig. 132).

A. Kornberg și colab. au explicat biosinteza ADN ca proces enzimatic. Ei au observat că în extractele de *Escherichia coli* se produc mono-, bi- și trifosfați care trec în ADN-ul insolubil. Prin fracționarea acestor extracte se pot obține fracții cu o bogată activitate de sinteză și care conțin sintetaza denumită și *ADN-polimerază*. Pentru sinteza ADN „in vitro" este nevoie de :

— ADN-polimerază ;
— *d*-ATP, *d*-GTP, *d*-CTP, *d*-TTP ;
— Mg^{++} ;
— ADN inițiator (sau „primer") care dirijează secvența bazelor noului ADN sintetizat (fig. 133).

Scanned with OKEN Scanner

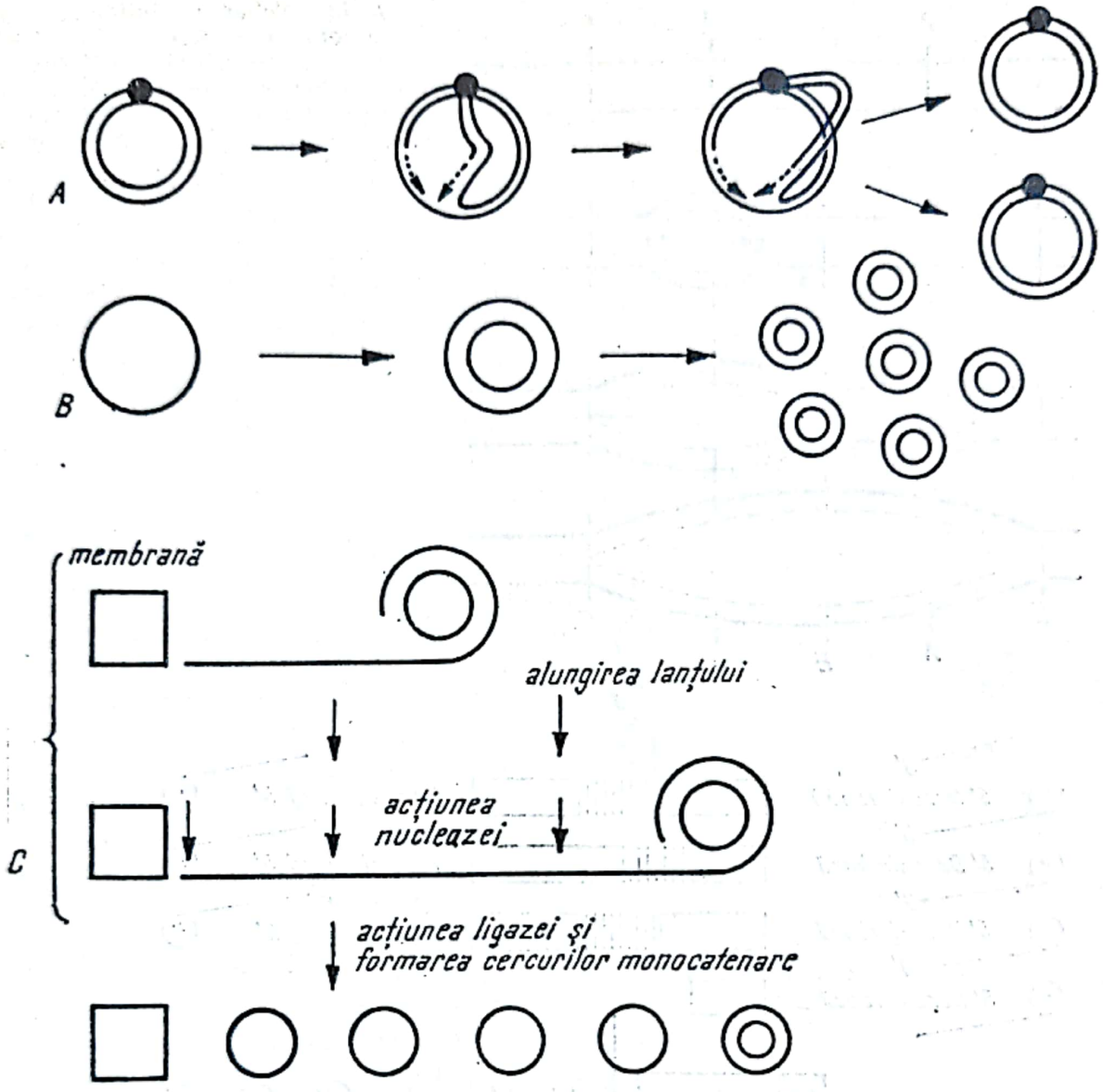


Fig. 131. Replicarea ADN :
A — ADN-ul în curs de replicare la *Escherichia coli* prezintă două „furci" care indică diviziunea cromozomului bacterian. Una dintre ele se deplasează și cînd o întîlnește pe prima se nasc doi cromozomi circulari ; *B* și *C* — replicarea ADN-ului fagului Ø × 174 (Explicația în text).

Prin experiențe mai noi, care folosesc fracțiuni „de strivire" a cromozomilor politenici servind ca inițiatori, se obține o replicare a ADN (într-un mediu cu ADN-polimerază, nucleotidele respective, dintre care una marcată și Mg^{++}) ce se evidențiază autoradiografic. Cu ajutorul unei ADN-polimeraze purificată provenită din bacterii, numită și *enzima lui Kornberg*, s-a reușit să se obțină o sporire considerabilă a cantității de ADN. Acest ADN neoformat conține baze de ADN inițiator și secvențe identice. Totuși, ADN-polimeraza nu poate realiza o replicare ca în concepția lui Cairns (fig. 134).

Scanned with OKEN Scanner

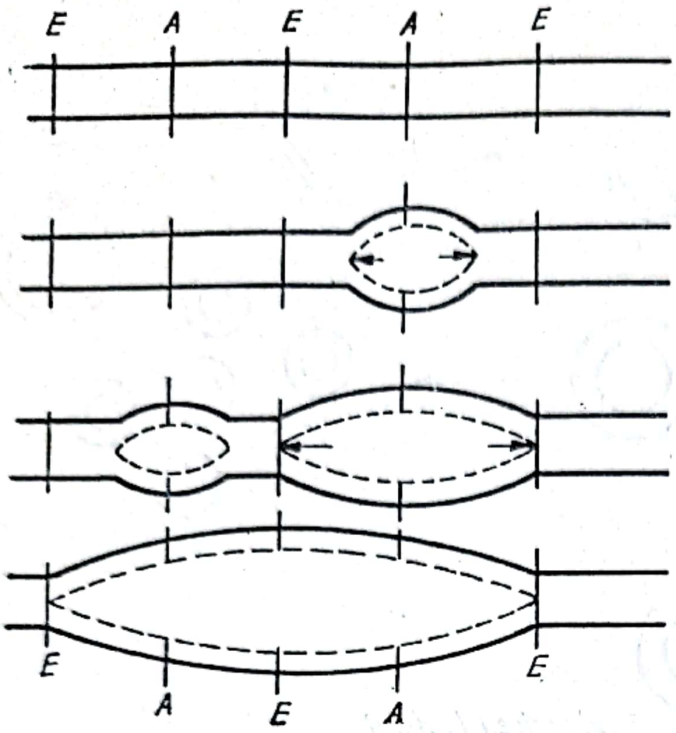


Fig. 132. Schema replicării unui fragment de ADN din două puncte de plecare diferite. Lungimea secvențelor de replicare este mai mică de 3 μ. Unele secvențe sînt atît de scurte, încît nu pot fi depistate autoradiografic.

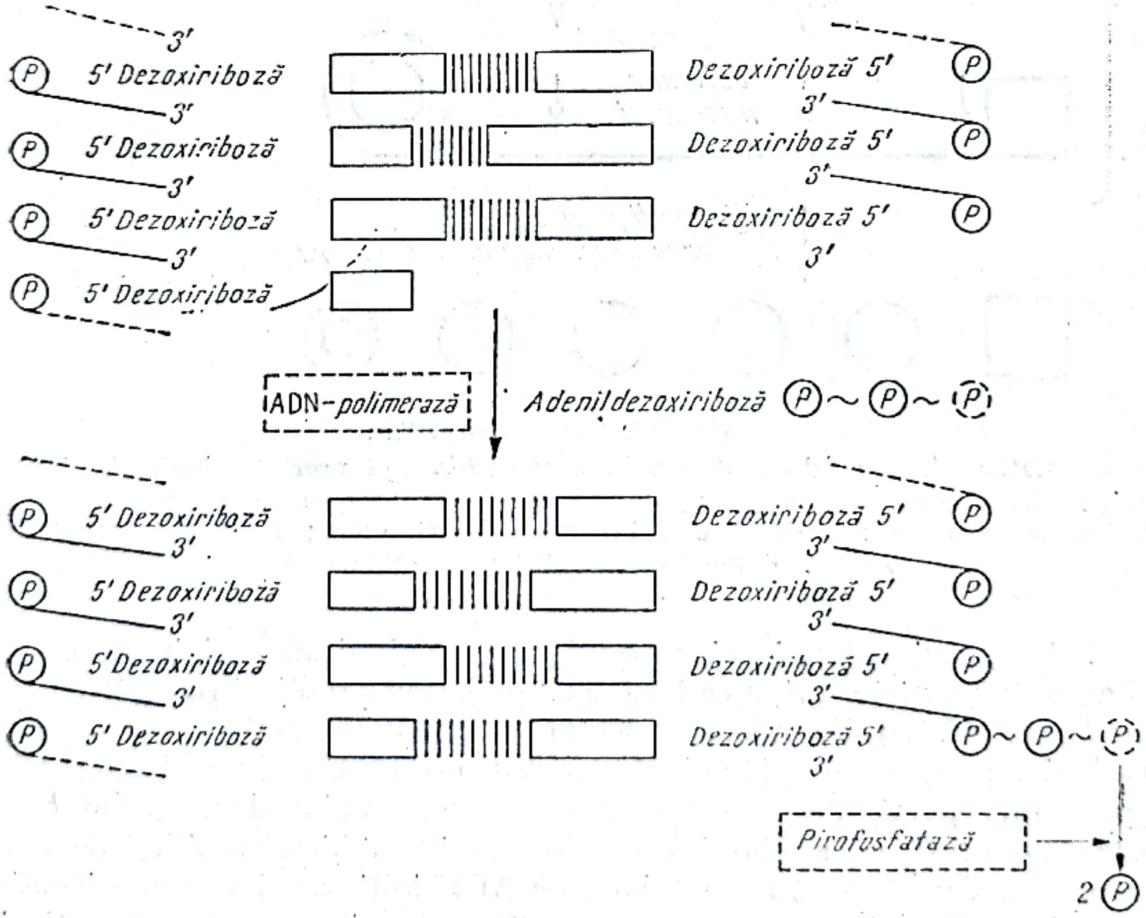


Fig. 133. Sinteza enzimatică a unui lanț de ADN, catalizată de ADN-polimerază (după W. Hayes).

Scanned with OKEN Scanner

A. Kornberg a conceput un mecanism de replicare prin care ADN-polimeraza produce o structură ramificată a ADN. Şi cum ADN-ul obţinut „în vitro" are aceeaşi compoziţie şi secvenţe de baze cu acela tipic, Kornberg a avut ideea să-şi imagineze lungimea concomitentă a ambelor lanţuri. Se pare că există şi o a doua enzimă înrudită ca acţiune care, împreună cu ADN-polimeraza, formează o *replicază* cu ajutorul căreia se catalizează neoformarea ADN. În cadrul acestei concepţii, ADN-polimeraza este o subunitate a aşa-numitei replicaze. În sprijinul acestei concepţii este faptul că în membrana celulară bacteriană activitatea ADN-polimerazei reprezintă o parte componentă a unui complex multienzimatic legat de lipide, cu toate că încă n-a putut fi izolat. Din diferite bacterii s-au extras diferite ADN-polimeraze incapabile de sinteza ADN în direcţia 5′-3′ ; aşa că altă cale pentru neoformarea concomitentă a celor două lanţuri de ADN este imaginată prin folosirea dezoxiribozidelor care, în poziţia 3', sînt activate. Pînă acum au fost găsite numai 3'-dezoxiribozide sub formă de monofosfaţi, dar nu şi ca trifosfaţi. Pînă în prezent nu s-a reuşit sinteza enzimatică a ADN din dezoxiribozid-3'-trifosfat.

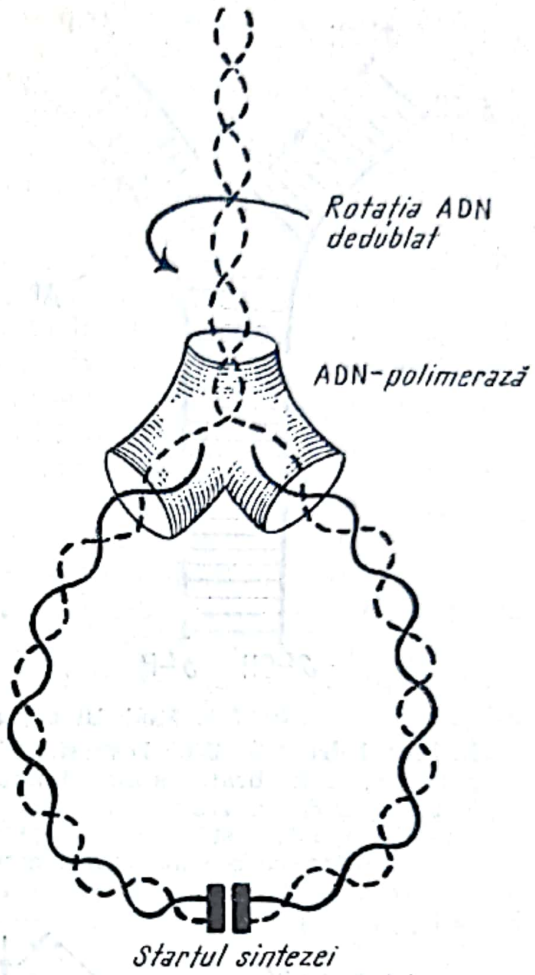


Fig. 134. Modelul de replicare a ADN de la *Escherichia coli* în concepţia lui Cairns.

Metoda autohistoradiografică, dezvoltată de Cairns, nu este suficientă ca să dovedească neoformarea ambelor lanţuri de ADN într-un loc. Aşa că, acceptînd ideea că respectivul loc de replicare reprezintă un segment ceva mai mare, apare probabilă dedublarea treptată a ADN prin acţiunea concomitentă a ADN-polimerazei cu ADN-ligaza care închide puntea polinucleotidică (fig. 135).

Kornberg a susţinut de la început că ADN-polimeraza sintetizează, alternativ, mai întîi o anumită porţiune dintr-un lanţ, apoi la celălalt lanţ alt nou ADN în direcţia opusă. Fragmentele de ADN formate în direcţia 3′-OH sînt legate de ADN-ligază (fig. 136). Cu alte cuvinte, replicarea ADN nu este continuă ci în trepte, printr-o acţiune combinată a ADN-polimerazei şi ADN-ligazei. Un argument în favoarea acestui mecanism este că după marcarea „în puls" a unui segment de ADN neoformat în celula procariotă se obţin, prin denaturare termică, fragmente de ADN scurte şi marcate. Mărimea unui fragment cores-

Scanned with OKEN Scanner

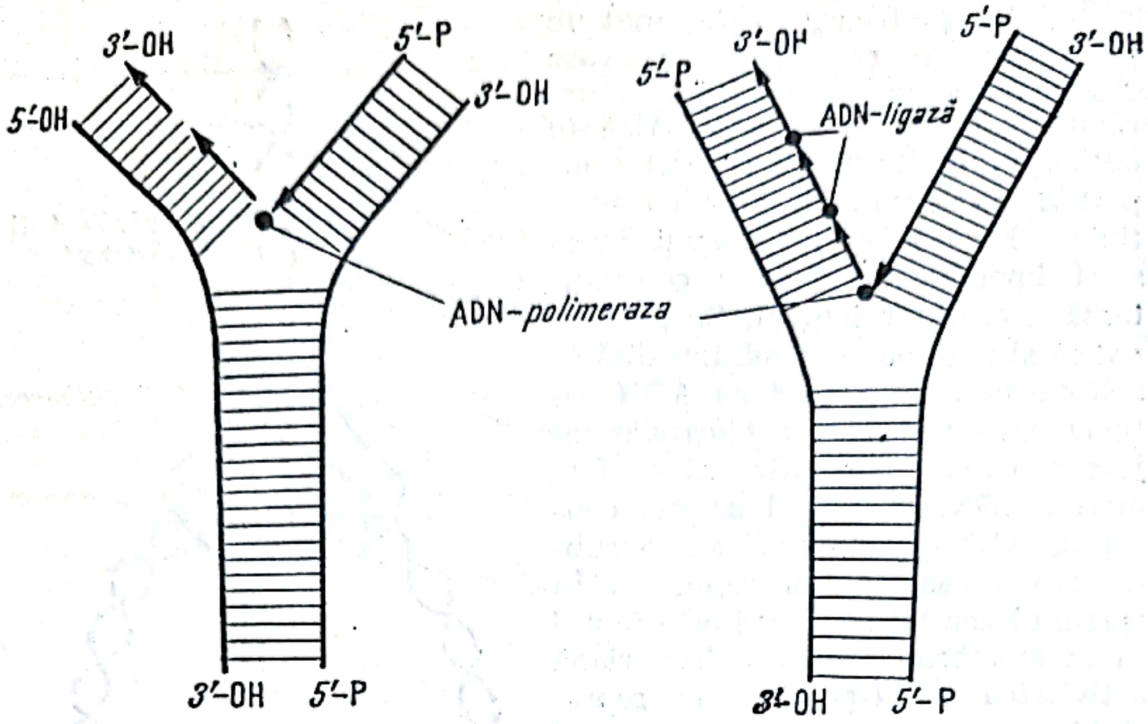


Fig. 135. Modelul acțiunii ADN-polimerazei și ligazei :
În brațul drept al Y-ului este sintetizat continuu lanțul complementar prin ADN-polimerază. În brațul stîng, dimpotrivă, se începe cu o despiralizare a moleculei-mamă de ADN pentru ca să se sintetizeze lanțul complementar în direcție opusă. Astfel se ajunge la formarea a nenumărate fragmente de ADN izolate care sînt apoi legate prin ligază. Săgețile indică direcția de sinteză a ADN-polimerazei.

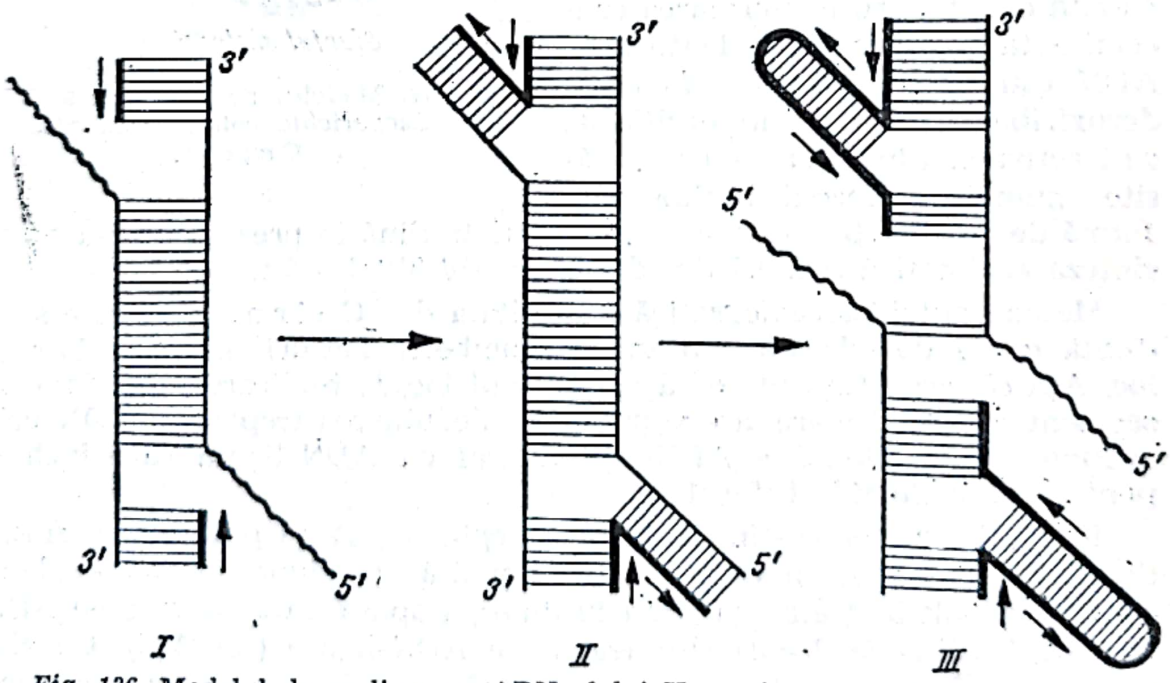


Fig. 136. Modelul de replicare a ADN al lui Kornberg, Schwed-Kraut și Richardson.
ADN-polimeraza începe sinteza ADN folosind pentru început lanțurile 3'-OH ca matrice (*I*) și conduce la neoformarea ADN și la capătul 5' liber (*II*). Noile ramificații formate după despiralizarea ADN folosesc enzima ca să-și „tipărească" pe matricea lor alte lanțuri noi de ADN (*III*).

Scanned with OKEN Scanner

punde unui cistron și are un coeficient de sedimentare de 10S. Scăderea activității ADN-ligazei a dus la creșterea numărului acestor fragmente de ADN cistronic. Mecanismul dedublării ADN, așa cum are loc în celula vie, este destul de neclar totuși. Pînă în prezent mecanismul replicării în trepte a sintezei discontinue este admis ca cel mai plauzibil. Mecanismul implică cel puțin două enzime, iar ADN-ligaza a fost găsită și în celulele care se divid activ ale mamiferelor.

Deși abia tîrziu s-au cunoscut limitele activității ADN-polimerazei, și anume că ea singură nu poate cataliza dedublarea normală a ADN, totuși, cu ajutorul său, s-a arătat că secvența bazelor ADN neoformat este „copiată" stabil de către ADN primar, cu o eroare de abia 10^{-6}; „in vitro", sînt 1000 nucleotide pe minut la molecula de enzimă, „înlănțuite". Enzima poate „recunoaște" dezoxiribozid-trifosfații și structura părții pentozofosfat, dar nu și diferitele baze purinice și pirimidinice. Iar cînd se folosesc precursorii marcați, se vede cum încorporarea lor are loc numai în condiția împerecherii bazelor complementare prin punți de hidrogen. Bazele la care o astfel de împerechere nu este posibilă, nu vor fi acceptate ca dezoxiribozid-trifosfat de către enzimă. Asemenea mod de acțiune a ADN-polimerazei explică de ce în afară de cele patru baze de ADN mai pot fi incluse în lanț și altele. Așa, de pildă, timina poate fi înlocuită prin uracil sau prin derivatul său halogenat 5-bromuracil. La fel și citozina poate fi înlocuită prin 5-metil sau 5-bromcitozină, iar guanina prin hipoxantină.

Aceste constatări arată importanța funcțională a kinazelor care aduc în mod specific numai cele patru baze ale ADN-dezoxiribozid-trifosfaților și împiedică folosirea bazelor false. Anumiți analogi ai bazelor pot să fie însă incluși în ADN „in vitro", iar atunci se modifică proprietățile de matrice ale acestuia.

ADN-polimeraza de la bacterii are o GM de 109 000 și nu este compusă din subunități. În zona centrului activ al enzimei se formează uneori o legătură de dezoxiribozid-trifosfați; mai departe, se ajunge la o legătură cu porțiuni de dublu helix de ADN în care există o neînsemnată despiralizare prin desfacerea punților de H (sînt așa-zisele regiuni de crestătură). După izolarea ADN-polimerazei din *Escherichia coli* s-au reîntîlnit asemenea sinteze și în alte celule. La eucariote ele iau naștere în nucleu, iar în citoplasmă sînt legate de prezența ADN mitocondrial, cloroplastic și vitelin. La mamifere ele au o activitate mult mai redusă decît enzima lui Kornberg, însă activitatea de bază a enzimei în diferitele țesuturi animale este evident aceeași, deosebindu-se numai în privința proprietăților necesare unei sinteze optime de ADN „primar".

În mod normal, ADN-polimeraza poate forma un nou ADN pe o matrice de ADN deja existentă. Dacă se incubează un surplus de enzime cu ADN-polimerază de la *Escherichia coli* 5—6 ore, se obține un nou ADN, fără ca matricea ADN-ului să fi fost prezentă. Dacă se folosesc ca precursori numai ATP și TTP, apare un ADN în care cele două baze alternează și formează un dublu helix [Poli-*d* (AT)]. S-a reușit chiar în mod analog să se producă artificial ADN cu *G* și *C*, dar fără o alternanță între ele riguroasă.

Prezența ARN-polimerazei frînează activitatea ADN-polimerazei. Dacă în adausul de ADN-polimerază ionii de Mg sînt înlocuiți cu Mn, este

posibil ca unul din cei patru dezoxiribozid-trifosfaţi să fie înlocuit cu ribozid-trifosfatul corespunzător, astfel că pe această cale se ajunge la formarea unui ADN mixt în ceea ce priveşte partea pentozică, dar care corespunde ADN-ului primar ca secvenţe de baze.

Pentru că legătura 5′-fosfoester al ribozei este labilă într-un mediu alcalin în care acest ADN este descompus, toate încercările făcute „in vitro" cu ADN-polimeraza pentru dovedirea unei multiplicări a ADN primar şi a intensificării activităţii sale biologice nu au reuşit sau au condus la rezultate nesatisfăcătoare. Deşi s-au reuşit sinteze enzimatice „in vitro", în mai multe trepte, a unui ADN viral monocatenar cu infecţiozitate, totuşi lucrurile nu s-au clarificat pe deplin la eucariote. ADN-ul bacteriofagului Ø × 177 este inelar şi, cum s-a mai arătat, pentru multiplicarea sa el trece într-o formă dublu catenară (fig. 137, *A* şi *B*). În desenul *A* se vede cum printr-o ADN-polimerază bacteriană se obţine forma (—) care, cu ligază, se închide în jurul ADN (+) primar. În cadrul acestei sinteze se foloseşte în loc de *d*-TTP normal un analog al timinei, 5-bromuracilul, ca dezoxiribozid-trifosfat. Densitatea mai mare rezultată din conţinutul în brom a ADN (—) produs artificial permite, după o denaturare termică, separarea în gradient de concentraţie a ADN viral (+) introdus ca matrice. O altă variantă a procedeului descris privind ADN (—) cu brom în matriţă duce la formarea unui nou ADN (+), care este activ biologic (fig. 137, *B*).

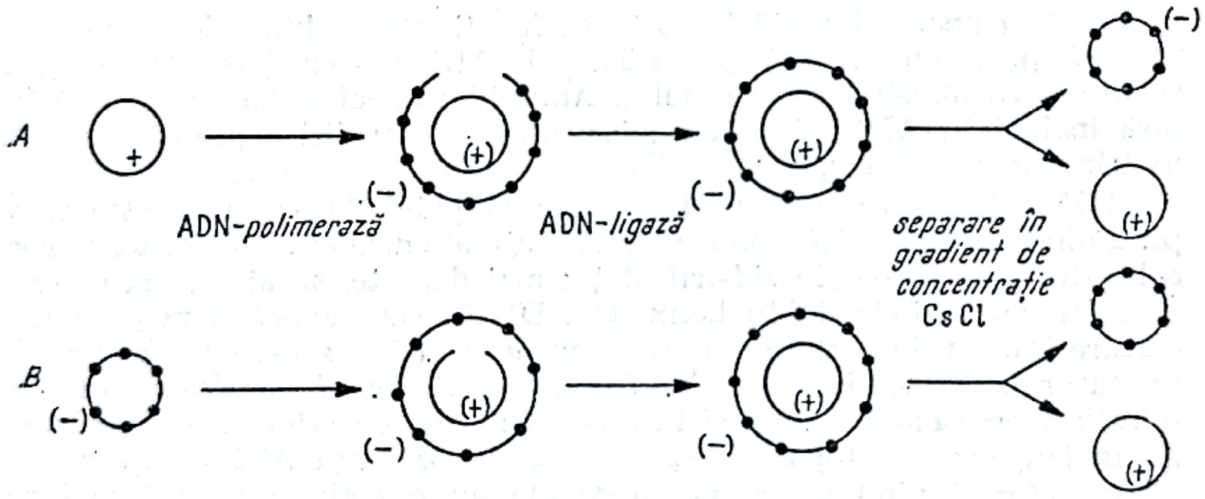


Fig. 137. A, B — etape în sinteza enzimatică a fagului Ø × 174, biologic activ.

Acest gen de experienţe arată cu cîtă precizie se realizează funcţiile de matriţă ale ADN chiar în prezenţa analogilor. Aşa se face că ADN poate conţine, în afara celor patru baze obişnuite şi alte două baze noi şi anume 5-metilcitozina şi 6-metiladenina. Metilarea, care duce la formarea acestor baze, se realizează pe lanţul polinucleotidelor. Cu ajutorul diferitelor substanţe ca proflavina sau actinomicina, care formează complexe cu ADN, se inhibă metilarea ADN. Această metilare a ADN nu are o influenţă mare asupra proprietăţilor lui de matrice, sub acţiunea ADN-polimerazei. Pe lîngă o formare de ADN nou cu ADN-polimerază, se ajunge la construirea nucleotidelor simple din ADN preexistent. S-a

Scanned with OKEN Scanner

mai izolat o enzimă din timus de vițel care conduce la o alungire a lanțului de ADN primar de la 50 la 600 nucleotide. Aceasta este o dezoxinucleotidil-transferază terminală.

Compoziția în baze a oligo- și polinucleotidelor nou formate nu este determinată de un ADN-matriceal ci de felul precursorilor existenți. În locul unui ADN inițiator sînt suficiente oligonucleotidele, pînă la trinucleotide. În mod ipotetic, pentru funcția de „inițiere" este necesară o grupare liberă 3′-hidroxil. Pe de altă parte, la *Escherichia coli*, infectată cu fagul *T*, s-a descoperit o enzimă (5′-hidroxil-polinucleotid-kinaza), care catalizează fosforilarea ADN și ARN, în afara ATP, CTP, GTP sau UTP ca donatori de P. Enzima duce la îmbogățirea cantitativă a fosforului la 5′-hidroxili liberi, așa încît lanțul respectiv de ADN să poată fi legat cu un alt ADN printr-o ligază.

ADN cromozomal, purtător al informațiilor ereditare, se replică în urma unor procese biochimice pregătitoare datorită următorilor factori :

1. Existența unui stimul chimic citoplasmatic, care, în anumite condiții, induce sinteza ADN. Foarte posibil că acesta să existe sub forma unor molecule mici care determină intrarea nucleului în faza *S*. Într-adevăr, nucleii în G_1 sau în afara ciclului, transplantați la începutul fazei *S*, încep sinteza ADN.

2. Asemenea proteine simple din *S* (diferite de cele din G_1) modifică structura cromozomilor, făcînd accesibile punctele de inițiere. Ele nu declanșează *S* decît atunci cînd ajung într-o anumită concentrație.

3. Sinteza ADN se produce în momente diferite în aceeași citoplasmă, fiind în orice caz bidirecțională. Numărul unităților de replicare pe celulă la un anumit moment dat din *S* este între 10^3—10^4. Replicarea bidirecțională a ADN a fost evidențiată cu ajutorul marcajului ^{3}H-timidină în celulele eucariotelor, unde sinteza se inițiază într-un punct de pe cromozomi și apoi progresează în două direcții opuse de-a lungul cromozomului, cu o viteză de replicare de 0,5—1,2 μ/minut.

Pentru a se demonstra sinteza ADN la nivel cromozomal s-a folosit ^{3}H-timidină cu care s-au tratat culturile celulare, după care s-au efectuat autohistoradiografii. Dacă durata cît s-au tratat culturile cu timidină tritiată este mai mare decît perioada G_2, atunci se marchează ADN de la sfîrșitul perioadei *S* (ADN sintetizat tîrziu) ; dacă marcajul durează cît perioada G_2, plus o parte din *S*, atunci se marchează sinteza inițială de ADN. Fiecare cromozom va prezenta în aceste condiții o porțiune marcată mai mare sau mai mică, așa fel încît marcajele ocupă diferite locuri la începutul și la sfîrșitul sintezei ADN. Asincronia dintre inițierea și terminarea sintezei ADN pe fiecare cromozom este caracteristică, prezentînd un profil constant pentru fiecare tip celular, în cadrul ciclurilor sale.

La *Drosophila*, de exemplu, diferitele regiuni ale cromozomilor politenici ai glandelor salivare inițiază în același timp sinteza ADN dar o termină în momente diferite. În orice caz, este pe deplin dovedit că heterocromatina replică ultima. Asemena situații se întîlnesc și la *r*-ADN nucleolar care, în unele cazuri, prezintă o replicare tîrzie.

D. Prescott și L. Goldstein (1973) au transplantat nuclei de amibe din perioada G_2 în citoplasma unor amibe în *S*, constatînd fap-

Scanned with OKEN Scanner

tul surprinzător că ei nu-şi încep sinteza de ADN. Numai nucleii în *S* îşi continuă biosinteza, cînd sînt transplantaţi într-o citoplasmă G_2.

Aceasta ne face să presupunem că nucleii G_2 cu sinteza ADN terminată ori nu o mai reîncep, ori inductorul sintezei are o viaţă scurtă, existînd numai în prima parte a fazei *S*. Dat fiind efectul citoplasmei în G_2 asupra nucleilor în *S*, înseamnă că ea nu conţine nici un inhibitor al sintezei care, odată începută, continuă şi într-o citoplasmă străină. Cînd au fost injectaţi nuclei aflaţi în faza G_1 într-o citoplasmă în *S*, aceştia au început sinteza ADN chiar mai devreme ca de obicei. Aşadar, se poate vorbi despre o substanţă stimulatoare a sintezei ADN prezentă în citoplasma *S*, care poate activa sinteza nucleilor G_1, dar nu şi a celor aflaţi în G_2. Fenomenul odată început va continua şi în absenţa acestui starter.

Ca procesul de replicare a ADN să se desfăşoare din plin este nevoie stringentă de o biosinteză proteică. Cerinţa de proteine este mai mare la începutul fazei *S* decît la sfîrşitul acesteia. Inhibitorii sintezei proteice (cicloheximida şi puromicina) reduc mult sau chiar opresc replicarea ADN, cu precădere în *S* timpuriu şi au un efect mai slab în *S* tardiv. Acest efect al cicloheximidei se exercită numai asupra nucleului nu şi a biosintezei proteice mitocondriale necesară replicării ADN propriu. Deci iniţiatorul sintetizat de ribozomii mitocondriali este insensibil la cicloheximidă. Administrarea cicloheximidei sau a puromicinei în faza G_1 a culturilor celulare sincronizate determină întîrzieri în startul spre *S*, proporţionale cu durata tratamentului şi independent de poziţia lor în faza G_1. Acest rezultat se poate datora atît întîrzierii în realizarea unei concentraţii eficiente a proteinelor iniţiatoare, dar şi unei întreruperi a proteosintezei chiar înainte de startul fazei *S*.

Dozele mari de actinomicină-D, pe lîngă inhibarea transcripţiei *r*-ADN, pot bloca şi replicarea ADN în faza *S* timpurie, ceea ce l-a făcut pe S. Cleffmann să considere că sinteza proteinelor are loc doar la începutul fazei *S*. În doze mici, actinomicina-D inhibă sintezele chiar cu două ore înainte de faza *S* a celulelor ascitice.

Sinteza ARN are loc în tot cursul ciclului celular, în afară de mitoză cînd ea se opreşte. Marcajul cu ^{3}H-uridină arată, în culturile celulare ale mamiferelor, că biosinteza ARN se opreşte în profaza tîrzie şi reîncepe în telofază. Aceasta se explică prin superînfăşurarea cromozomilor metafazici. În schimb, duplicarea ADN face imposibilă transcripţia; replicarea ADN are loc totuşi în mitocondrii.

G. Zetterberg şi D. Killander au constatat că celulele mamiferelor sintetizează în mod constant ARN care se dublează în a doua jumătate a ciclului celular, în timp ce se sintetizează ADN. Dublarea ratei sintezei ARN în faza *S* a ciclului celular, dintre care 80% este ribozomal, este datorită unui efect de gene, în sensul că genele *r*-ADN sînt multiplicate de sute de ori.

Recent s-au obţinut linii celulare stabilizate pe care s-a putut urmări sinteza ADN în cursul ciclului celular prin marcaje cu ^{3}H-uridină. Culturile sînt sincronizate prin reînnoirea mediului şi prezintă patru maxime de încorporare, respectiv de sinteză a ARN: unul imediat după schimbarea mediului, al doilea după 2 ore, al treilea la 11—16 ore şi al patrulea înainte de mitoză, după 24 ore. Primul maxim corespunde (poate)

Scanned with OKEN Scanner

ARN necesar inițierii sintezei. Unele lucrări recunosc existența doar a două maxime de sinteză a ARN, și anume în faza G_1 și G_2, iar altele numai a unui singur maxim, între G_1 și S.

G. Zetterberg și D. Killander au arătat că rata acumulării ARN citoplasmatic crește dublu față de conținutul în ADN al celulei în interfază. Sinteza r-ARN este condiționată de multiplicarea genelor ribozomale care, prin numărul de ribozomi, determină indirect biosinteza proteică. Numărul de gene fiind o constantă de specie (800 pentru genomul haploid de *Xenopus*), urmează că și acela al ribozomilor este limitat, ca și cantitatea de proteine. O experiență în acest sens a constat în marcarea cu ^{3}H-uridină, la intervale scurte, a celulelor HeLá sincronizate printr-o selecție a mitozelor. Marcarea în „puls" cu ^{3}H-uridină a arătat o încorporare lentă în G_1, o dublare rapidă în prima jumătate a lui S, o rată constantă în a doua jumătate a lui S și în G_2. Aceasta, pentru că în perioada S se dublează stocul diploid de cromozomi, implicit și genele r-ADN care sintetizează ribozomii. De asemenea, paralel cu r-ARN se sintetizează t-ARN și încă un ARN care se marchează rapid, dar care nu trece ca atare în citoplasmă.

Proteinele nehistonice, izolate din fibroblaștii șoarecelui, sînt legate de ADN fiind sintetizate la începutul fazei S și cresc continuu în interfază, scăzînd cu 80% în cursul mitozei. Biosinteza proteinelor este necesară atît inițierii replicării ADN cît și confecționării unui schelet proteic care menține integritatea structurală a cromozomilor formați din dublul helix de ADN.

Sinteza enzimelor prezintă două aspecte importante : unul este acela al *sintezei continue*, în cursul ciclului celular, iar celălalt al *sintezei periodice*. Studiile lui Mitchison (1969), făcute pe culturi de celule sincronizate, au arătat că pentru o sinteză continuă diagrama creșterii sale poate fi cu „treaptă" sau cu „vîrf", iar pentru o sinteză periodică poate fi cu creștere exponențială sau liniară.

Sinteza periodică a enzimelor în cursul ciclului celular are două mecanisme de control : unul, denumit *represie oscilatorie*, este întîlnit la procariote și are la bază un mecanism de „feed-back" (inhibiție prin produs final) ; celălalt mecanism de la eucariote poartă numele de *transcripție secvențială*, pentru că genele transcriu în aceeași ordine după așezarea lor liniară pe cromozom. Așa, de pildă, o ARN-polimerază se poate mișca de-a lungul cromozomului transcriind o genă în secvența sa, cu alte cuvinte ea este transcriptibilă și inductibilă într-un anumit interval din ciclul celular.

Saccharomyces dobzhanskii are o β-glucozidază per ciclu. În urma încrucișării cu *Saccharomyces fragilis* ia naștere un hibrid care prezintă două izoenzime, antigenic distincte. În cadrul unui control de represie oscilatorie ne-am aștepta să avem o treaptă cînd, în realitate, apar două, ceea ce indică existența a două gene non-alele care transcriu în diferite momente ale ciclului. Enzimele sintetizate continuu au un mecanism de control diferit. În unele cazuri controlul se face prin translație liniară, cînd sinteza se dublează la un moment dat al ciclului.

Punctul de dublare al cantității de enzime corespunde celui de replicare a genei respective.

Scanned with OKEN Scanner

Cele două tipuri de *r*-ARN, și anume 28S al subunității 60S și 18S al subunității 40S, sînt sintetizate în nucleol unde, dealtfel, constituie componenta granulară. Tot aici se completează cu proteinele bazice nucleolare și formează subunitățile ribozomale. Cu cît biosinteza proteică celulară este mai intensă, cu atît numărul ribozomilor este mai mare și, ca atare, nucleolul este mai voluminos, așa că orice variație a activității nucleolare are consecințe asupra creșterii celulare sau a formării diferitelor proteine „de export". Cele două tipuri de *r*-ARN sînt transcrise pe două gene deosebite ca loci.

M. Birnstiel a demonstrat aceasta prin *metoda hibridării intermoleculare* (fig. 138). După ce s-a denaturat ADN pentru a se putea separa cele două catene ale dublului helix, le-a incubat cu *r*-ARN marcat.

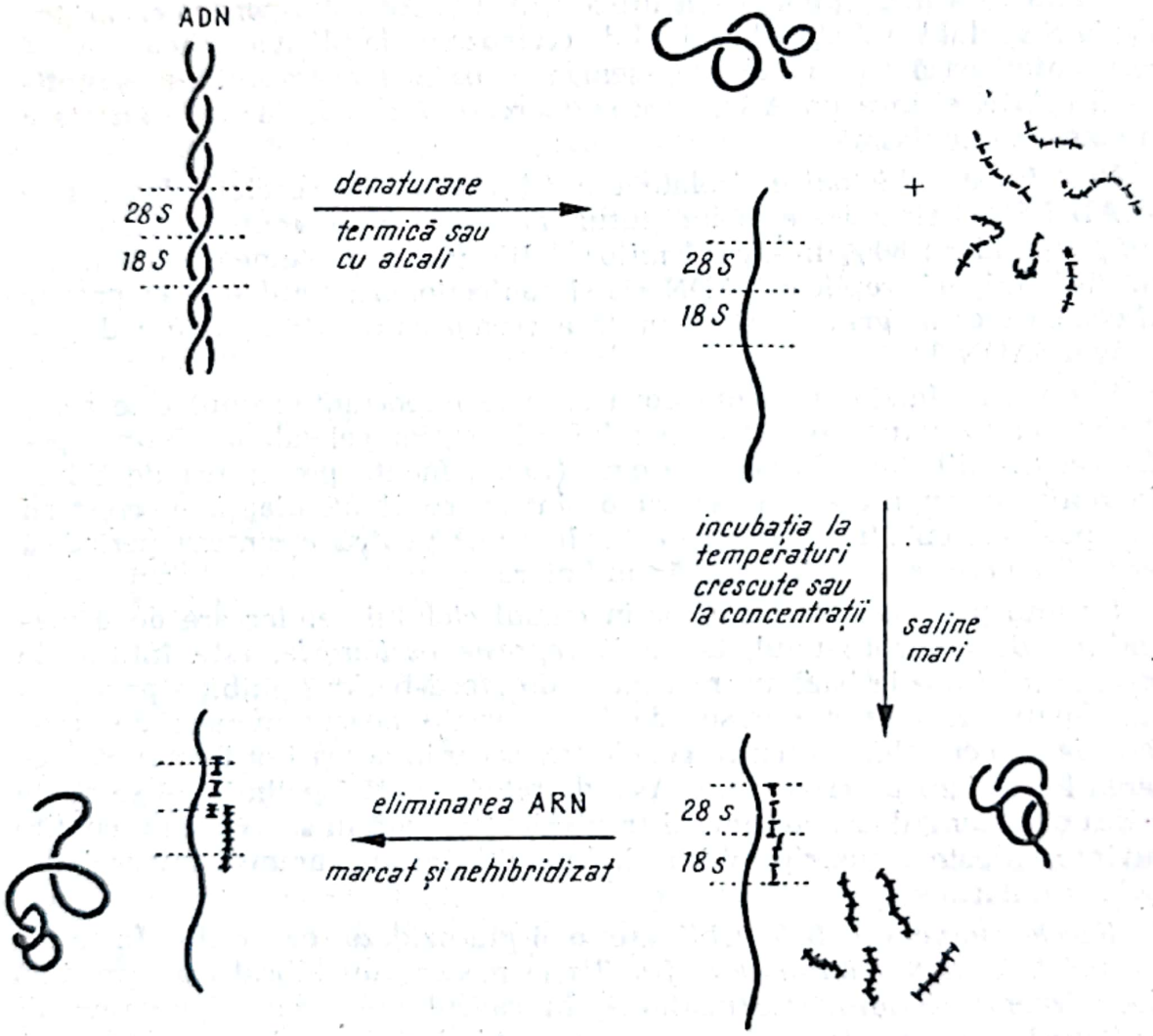


Fig. 138. Metoda hibridării intermoleculare folosită să se identifice și să se măsoare *r*-ARN.

ADN este denaturat separîndu-se cele două catene ale dublului helix. ADN astfel denaturat este incubat cu r-ARN marcat în condițiile care permit alipirea bazelor complementare. ARN se așază de-a lungul porțiunilor de ADN care au secvențele complementare cu ale lui, cu alte cuvinte gene care codifică ARN ribozomal. Se formează astfel molecule hibride de *r*-ADN cu *r*-ARN. Măsurîndu-se radioactivitatea lor se poate calcula numărul de gene cu ale ribozomilor.

Scanned with OKEN Scanner

ARN radioactiv se leagă selectiv cu secvenţele complementare de ADN. Numărul moleculelor de *r*-ARN care se leagă cu ADN corespunde exact cu numărul de gene care codifică *r*-ADN. La *Xenopus*, numai 0,3% din ADN-ul total are baze complementare cu *r*-ARN, aşa că genele ribozomale ale ADN nucleolar reprezintă 0,3% din genom. Această fracţie de *r*-ADN codifică 1600 lanţuri de *r*-ARN 28S şi tot atîtea lanţuri de *r*-ARN 18S pentru celulele cu doi nucleoli. ADN-ul organizatorului nucleolar, care codifică *r*-ARN este mai bogat în guanină şi citozină, iar densitatea sa este mai mare cu a restului de ADN cromozomal, care este mai bogat în adenină şi timină. Centrifugarea în clorură de cesiu arată o bandă de densitate de 1,724 g/ml, care corespunde la *r*-ADN şi care reprezintă 0,3% din ADN-ul total al celulelor binucleolate de la *Xenopus*. La mutantele cu un nucleol cantitatea de *r*-ARN este pe jumătate.

Datorită acestor experienţe s-a putut preciza poziţia reciprocă a genelor care codifică cele două feluri (28S şi 18S) ale *r*-ARN. Dacă cele 800 de gene 28S ar forma un bloc unic, deosebit de blocul genelor 18S, s-ar putea calcula după conţinutul celor două tipuri de *r*-ARN în guanină şi citozină şi observa în timpul centrifugării două benzi distincte, fiecare de o densitate specifică. Ori nu există decît o singură bandă ; aceasta, deoarece fiecare genă care codifică *r*-ARN 28S formează o secvenţă continuă, liniară cu o genă care codifică *r*-ARN 18S. Această dispoziţie este repetată pe toată lungimea celor 800 de gene.

Într-o altă experienţă s-a putut confirma, de asemenea, această interpretare. Astfel, sedimentarea ADN — *r*-ARN în gradient de clorură de cesiu corespunde la o mare densitate. Cu cît *r*-ARN complementar secvenţei ADN-ului studiat este în mai mare cantitate, cu atît banda care corespunde hibridului se deplasează către regiunile de mare densitate. Fragmentîndu-se *r*-ARN în segmente scurte, care conţin numai o singură pereche de gene — o genă 28S şi una 18S — după o incubare cu un excedent de *r*-ARN 18S se constată că se formează molecule hibride. Sedimentarea lor corespunde la densităţi cu atît mai ridicate, cu cît cantitatea de *r*-ARN adăugată este mai mare. Dar, la un moment dat, oricît s-ar adăuga *r*-ARN 18S nu se mai deplasează banda hibridă. În schimb, ea se deplasează la un adaus de *r*-ARN 28S. Deci, acelaşi fragment de ADN care hibridează cu *r*-ARN 18S poartă secvenţele care hibridează şi cu *r*-ARN 28S. De aici şi concluzia că în cromozom genele 18S şi 28S au o aşezare liniară, una în urma celeilalte. Dar, în fapt, cantitatea totală a sedimentului de ADN din banda cu densitate mare este mai mare decît aceea stabilită prin calcule şi care corespunde la dimensiunile celor 800 de gene 18S şi 28S ale *r*-ARN. Diferenţa se datoreşte unor spaţii dintre 18S şi 28S şi care nu au rol în formarea *r*-ARN.

La eucariote sinteza acestor doi precursori ai *r*-ARN este simultană, realizîndu-se o macromoleculă care se fragmentează prin hidroliză într-o moleculă de *r*-ARN 18S, alta de 28S şi, în fine, o cantitate excedentară de *r*-ARN. Locusul cromozomic care codifică acidul ribonucleic ribozomal conţine 800 segmente identice la *Xenopus*, cu o secvenţă de nucleotide identică. Cum în celule se realizează în acelaşi timp şi din aceeaşi moleculă amîndoi acizii ribonucleici pentru cele două subunităţi ribozomale, înseamnă că se vor obţine ribozomi completi.

Scanned with OKEN Scanner

O. L. Miller şi B. R. Beatty (1969) au putut măsura „sitele calde" de sinteză a ARN de pe r-ADN (ADN-ul organizatorului nucleolar). Aceste site se găsesc la intervale regulate şi au o lungime de 2,5 μm. Ele codifică o moleculă cu o greutate moleculară de 2,5 milioane daltoni. Deci s-a putut observa şi măsura lungimea genelor. De asemenea, produsul lor — ARN-ribozomal — apare ca fibrele ce se ramifică din r-ADN, legîndu-se în acelaşi timp cu proteinele bazice. Transcripţia r-ARN pe r-ADN-ul organizatorului nucleolar durează cîteva minute, dar metilarea unor nucleotide şi formarea subunităţilor ribozomilor se fac într-o oră (fig. 139).

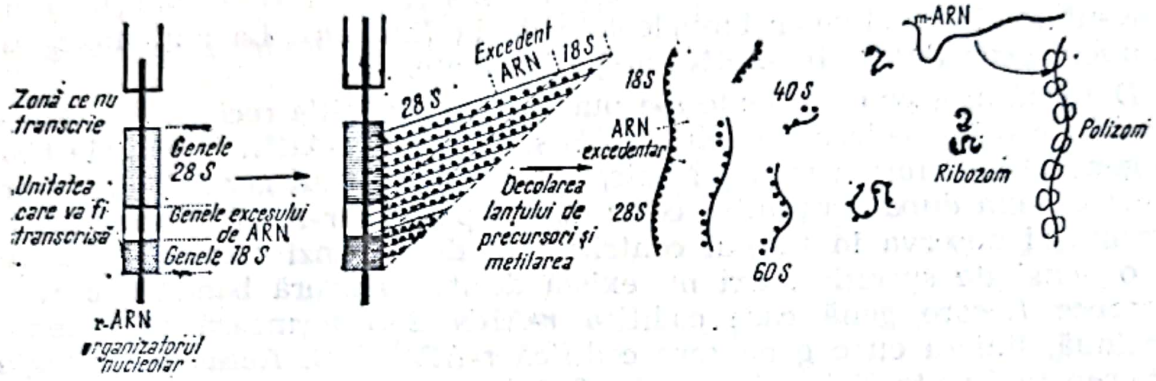


Fig. 139. Biosinteza ribozomilor şi funcţia principală a nucleului.
Organizatorul nucleolar corespunde la acel segment din cromozom care conţine un r-ADN bogat în guanină-citozină. Toate unităţile de transcripţie care codifică precursorii r-ARN sînt dispuse liniar pe r-ARN şi sînt separate de zone unde nu se transcrie nimic. Cele două gene care codifică cei doi precursori sînt localizate pe aceeaşi unitate de transcripţie care produce la mijlocul său un ARN excedentar. Precursorii acidului ribonucleic ribozomal sînt complexaţi cu proteinele, metilaţi şi apoi separaţi în trei: ARN 40S, 60S şi cel excedentar. Primii doi ajung în citoplasmă, se asociază şi cu alte proteine, reconstituind ribozomii (după Miller).

Deci, genele ribozomale sînt în număr mare: 800 pentru genomul haploid de *Xenopus*, în general animalele avînd cîteva sute iar plantele cîteva mii. Aceşti policistroni ribozomali sînt omogeni în sensul că transcriu un acid ribonucleic ribozomal omogen. Ei sintetizează 15 000 de molecule precursoare de r-ARN menţinînd, astfel, o „producţie" de ribozomi în ritm nictimeral cu diviziunea mitotică. De-a lungul celor 2,5 μm de r-ADN genetic activ se găsesc 100 de molecule de ARN-polimerază cu un Ø de 12 μm fiecare; la 25 μm ADN se găseşte cîte o moleculă de ARN-polimerază.

Pentru a se menţine un ritm normal de sinteză proteică celula trebuie să aibă cel puţin 150 de gene ribozomale. Or, complementul cromozomal asigură mult mai mult decît acest necesar. În primele stadii precoce ale oogenezei, ritmul biosintezei proteice este foarte crescut deoarece oocitele tinere ajung să aibă 10^{12} ribozomi faţă de o celulă somatică care are numai 3,3 milioane. Aceste mii de miliarde de ribozomi sînt asigurate de o amplificare genică, în sensul că r-ADN se multiplică de sute de ori realizîndu-se sute de nucleoli cu un acid dezoxiribonucleic ribozomal extranucleolar, care continuă să transcrie acid ribonucleic ribozomal. Aceste perechi extracromozomale de ADN al organizatorului nucleolar sînt apoi

Scanned with OKEN Scanner

inhibate și, în cursul meiozei, sînt trecute în citoplasmă. Procesul de amplificare selectivă a genelor ribozomice este un fenomen caracteristic numai unor oogeneze (pești, broaște, tritoni, salamandre, unele diptere și coleoptere) de la animale.

10.4. PROTEINELE NUCLEARE ȘI CICLUL CREȘTERII CELULELOR

După cum se știe, în timpul înmulțirii exponențiale a celulelor normale, nucleul își dublează volumul și masa uscată. Aceasta din urmă este reprezentată de 75% proteine și 25% acizi nucleici (ADN și ARN). Măsurătorile făcute de R. Bassleer cu microscopul interferențial pe nuclei în stadii cunoscute au arătat că dublarea masei lor are loc în timpul perioadei *S*. În macronucleul ciliatului *Euplotes*, sinteza ADN începe de la capetele alungite ale acestuia spre centru și este concomitentă cu dublarea masei uscate, iar încorporarea aminoacizilor marcați are loc ceva mai înaintea zonei de sinteză a ADN. La fel și la fibroblaști, creșterea masei uscate, ca și a proteinelor nucleare este sincronizată cu replicarea ADN, însă acumularea proteinelor poate să aibă loc și în absența replicării ADN. Blocarea nucleilor în perioada G_2 prin iradiere cu raze X (care compromite mitoza), sau cu fluordeoxiuridină (care inhibă sinteza ADN), permite totuși o creștere, este drept mai mică, a masei uscate nucleare. Probabil că această creștere mică se datorește unui import de proteine citoplasmatice iar diferența este asigurată de o sinteză a proteinelor în nucleii care sintetizează ADN.

N. Ringertz descrie și explică astfel sinteza proteinelor nucleare (fig. 140). În timpul fazei G_1 proteinele sînt sintetizate în citoplasmă și poate chiar în nucleu ca proteine nehistonice. Așa se explică încorporarea aminoacizilor marcați în absența replicării ADN. Întrucît masa uscată a nucleului nu crește, înseamnă că migrația proteinelor în nucleu este egală cu o expulzare a lor în citoplasmă. În timpul fazei *S*, cantitatea de proteine care pătrunde în nucleu este mult mai mare decît aceea care iese din el. Histonele sînt elaborate în citoplasmă și pătrund în nucleu odată cu replicarea ADN în faza *S*, mărind mult cantitatea proteinelor nucleare.

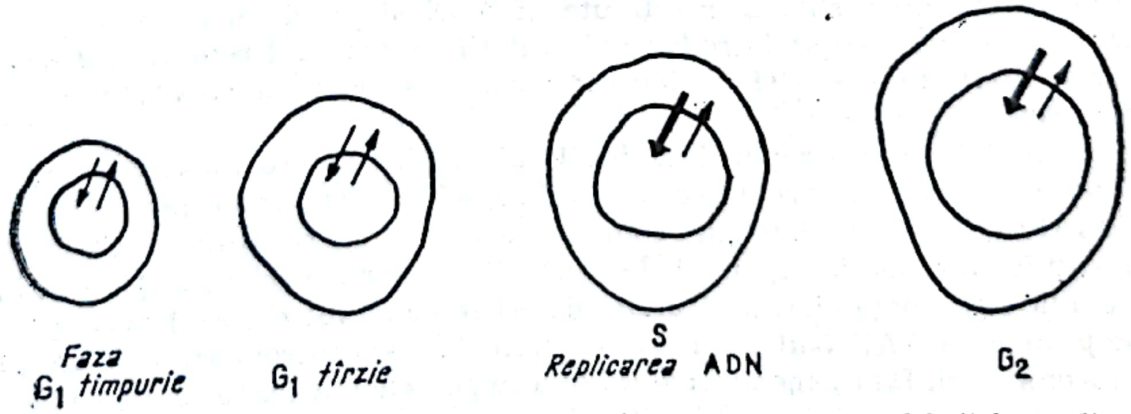


Fig. 140. Migrarea proteinelor prin membrana nucleară în diferitele stadii ale ciclului creșterii celulare (după N. Ringertz).

Scanned with OKEN Scanner

În timpul fazei G_2 proteinele nehistonice continuă să pătrundă în mare cantitate în nucleu, după care celula se va divide. Probabil că aceste sinteze au loc numai în fazele *S* și *G* și astfel unele dintre ele se suprapun cu replicarea ADN. Este bine stabilit că sincronismul replicării ADN cu acumularea de histone are loc în faza *S*, deoarece blocarea celulelor în faza G_2 prin iradiere cu raze X face ca histonele nucleare să rămînă în cantitate constantă, cu toate că masa nucleului continuă să crească. Histonele bogate în arginină se leagă cu axul zahăr-fosfat al ADN, integrîndu-se în structura acestuia, în timp ce histonele bogate în lizină și mai puțin bogate în lizină au rol de represori ai activității de transcripție a ADN. Dealtfel histonele, reacționînd cu cromozomii, produc condensarea lor.

10.5. FACTORII CARE REGLEAZĂ ACTIVITATEA NUCLEARĂ

Rolul ADN. Pe ADN s-a găsit o cantitate mică de peptide de mărime redusă, dar variabilă după felul țesutului și după specie. Peptidele ADN nuclear sînt legate covalent între grupările 3′-OH și 5′-PO_4 ale nucleotidelor printr-o legătură ester-carboxilică. Deci ADN reține strîns aminoacizii, aceasta constituind o proprietate a sa.

Secvențele repetitive ale ADN-ului eucariotelor intervin în producerea ARNs specific tisular, deoarece asemenea secvențe există în funcție de populațiile de ARNs specifice diferitelor organe. Și ca un corolar, trebuie să existe diferențe între procentul de transcripție al ADN care provine din diferitele organe ale aceluiași individ.

P. Walker (1969) explică diferențele mari dintre secvențele repetitive ale eucariotelor prin faptul că în cursul evoluției s-au produs modificări rapide ale ADN fără repercusiuni asupra nivelului de sinteză proteică. O serie de codoni apăruți în cursul evoluției, corespunzători aceluiași aminoacid, au fost păstrați în secvențele repetitive cu semnificația unor perfecționări ale funcționalității biosintezei proteice. Pentru alții, ADN repetitiv înseamnă gene reglatoare sau chiar rezervoare de mutații, deoarece secvențele foarte repetitive nu se transcriu, nu suferă influențe selective, sînt ușor reținute în ADN și joacă un rol structuralizant. Pe măsură ce se introduc noi mutații în genomul repetitiv, gradul de repetitivitate scade și se încorporează în genom ca secvențe intermediare.

Secvențele foarte repetitive sînt localizate în heterocromatina membranei nucleare din apropierea nucleolilor, adică a centromerilor și nu se transcriu „in vivo" datorită compactizării heterocromatinei. Ea este constituită din subunități mici de nucleotide, foarte variate după specii, și explică diferența cantității totale de ADN chiar între specii apropiate. Ele protejează *r*-ADN-ul organizatorului nuclear și centromerul de mutații și recombinări. De asemenea, ele asigură împerecherea cromozomilor omologi în meioză datorită simplicității și specificității lor, împiedicînd împerecherea cromozomilor de la specii înrudite. Asemenea secvențe au un

Scanned with OKEN Scanner

procent mutațional ridicat și constituie o rezervă de ADN unde se păstrează mutațiile, ele nefiind supuse selecției. Marcînd apariția unor specii noi, secvențele foarte repetitive scad odată cu creșterea numărului de mutații și de translocații, dispersîndu-se în genom. În această situație, ele pot servi ca situsuri de inițiere, de terminare, de acroșaj la membrana nucleului, de împerechere a cromozomilor omologi și de recombinări meiotice.

Condensarea cromatinei reflectă gradul repetitiv al ADN. La plantele anuale, la care nucleii sînt bogați în ADN, heterocromatina se replică mai repede ca eucromatina astfel că marea cantitate de heterocromatină este legată de reducerea duratei ciclului celular. În schimb, la mamifere, heterocromatina se replică tardiv.

Secvențele intermediare sau mijlociu repetitive sînt dispersate în genom, în alternanță cu secvențe mai complexe și provin dintr-un ADN satelit „criptic" prin mutații și translocații. Cînd secvențele sînt alternante au 150—400 perechi de baze iar cînd se prezintă unice pot avea între 750—1000 perechi, ansamblul formînd 50% din genom, restul fiind constituit din secvențe lungi unice și alternante (20%) sau nu (22%) cu zone repetitive mai lungi și cu secvențe foarte repetitive (6%) în tandem, care permit renaturarea rapidă a ADN monocatenar pe el însuși.

Secvențele repetitive alternante sînt denumite *divergente*, deoarece după renaturare se realipesc instabil în funcție de temperatură, în timp ce secvențele repetitive nealternative se realipesc stabil și au luat naștere mai recent, devenind, de fapt, ADN centromeric. Asemenea secvențe mijlociu repetitive sînt represate de fracția f_1 a histonelor și de o fracție a proteinelor acide, luînd parte la constituirea unei părți din *Hn*-ARN (acid ribonucleic heterogen nuclear) căruia îi conferă o structură secundară și îl apără astfel de acțiunea RN-azei nucleare. După detașarea secvențelor repetitive din ARN nuclear heterogen, care sînt degradate intranuclear, se desprind o serie de ARNs mesagere nerepetitive (care nu hidrolizează cu secvențele repetitive). Procentul de hibridare al secvențelor unice este de 2—8% din ADN-ul total și se află mai ridicat în creier unde este peste 8% decît în alte organe.

Rolul histonelor. Histonele prezintă o mare omogenitate, fiind aceleași în eu- și în heterocromatină, în cromozomii metafazici, în „puffuri", în cromatina nucleolară și extranucleolară etc. Prin f_1, și anume prin extremitatea *C* terminală, histonele se prind de secvențele mijlociu repetitive ale ADN și prin extremitatea *N* de alte molecule. Trebuie să remarcăm că la 2 ore înainte de faza *S* (la celulele de hamster în culturi sincronizate) începe o fosforilare a f_1 care ține pînă în profază, sub acțiunea unei fosfokinaze specifice. Ea este necesară decondensării cromatinei, și necesară deci activității ADN-polimerazei. Apoi o altă fosforilare, și anume a fracției f_3 și a unei subfracții f_1 din faza G_2 și profază, favorizează condensarea cromatinei în cromozomi.

E. Bradbury (1973) a dovedit aceasta prin adausul unei histon-fosfokinaze plasmodiilor de *Physarum polycephalum*, fapt care a declanșat mitozele în acest mixomicet. Se apreciază că fosforilarea subfracției

din f_1 produce o condensare a cromatinei (prin crearea unor legături încrucișate între fibre), fosforilarea f_3 formează punți — S-S — în metafază și fosforilarea f_2a_2 fixează regiunea N terminală a sa pe ADN. Acetilarea histonelor, și anume a f_1, coincide cu sinteza maximă a ADN, în schimb f_2a, f_2b și f_3 se acetilează la sfîrșitul sintezei ADN. Acetilarea precoce a histonelor, stocînd moleculele înainte de legarea lor de ADN, împiedică în același timp complexarea prea rapidă a acestora cu ADN. Acetilarea f_1 scade stabilitatea complexelor ADN-histone, a f_2a_1 provoacă distorsionări în conformația ADN, iar a f_3 derepresează activitatea ARN-polimerazei. Metilarea f_2b are loc în timpul sintezei ADN, iar a f_2a și f_3 după aceea, și anume la începutul mitozei, contribuind la condensarea cromozomilor (tab. 12).

Experimental, este bine cunoscut rolul histonelor de represori ai transcripției și replicării ADN : f_1 inhibă replicarea, în schimb transcripția este inhibată pînă la un anumit prag și, după G. Georgiev (1972), se reprimă secvențele mediu repetitive ale ADN ; f_3 inhibă ARN-polimeraza. Prezența grupărilor —SH în f_3 asigură protecția ADN din capul spermatozoizilor prin stabilirea punților — S-S — între histone, iar prin oxidarea grupărilor —SH histonele se leagă de proteinele acide.

Proteinele acide. Acestea se prezintă ca 15 fracții majore care saturează componentele reglajului ADN, fiind variabile cu specia, țesutul și în cursul dezvoltării embrionare. Ele cresc în cursul proliferării celulare însoțind o derepresie a genomului. Majoritatea proteinelor acide ale ADN sînt proteine ale membranei nucleare și ele stimulează specific transcripția întregului ADN prin derepresia acestuia. Anticorpii ADN-proteine acide inhibă specific sinteza ARN pe cromatină prin ARN-polimerază. Fosforilarea acestor fracții proteice acide ale cromatinei este specifică ; ele se localizează pe membrana nucleului și sînt capabile să „recunoască" specific unele secvențe ale ADN și secvențele complementare ale ARN. Dar proteinele acide nu sînt legate permanent de cromozomi ci migrează pe membrana nucleară. Fosforilarea are loc prin fosfokinază la începutul fazei G_1 și S, fiind deci un fenomen reversibil și dinamic și scade în G_2 și în mitoză. Ea este o consecință a derepresiei transcripției, reglează proliferarea celulară, transportă și transformă ARN sintetizat. Este însă cert că fosforilarea joacă un rol de prim rang în reglajul transcripției numai dacă luăm în considerare existența receptorilor hormonali care sînt proteine acide.

Hibridazele. Astfel au fost numite RN-azele care stimulează transcrierea ADN prin ARN-polimeraza II. Aceste RN-aze „digeră" capătul ARN-ADN nou format și astfel ARN-polimeraza continuă să sintetizeze mai departe.

Factorii citoplasmatici. Asemenea substanțe apar în citoplasma celulelor activate în sensul sintezei acizilor nucleici și, intrînd în nucleu, provoacă o creștere a transcripției. Chiar și histonele țesuturilor care proliferează sau pot prolifera au o funcție protează ce acționează asupra fracției histonice f_2c, reglînd astfel decondensarea cromatinei.

Scanned with OKEN Scanner

Asemănarea fracţiilor histonelor din timusul de viţel şi mazăre
(după D. M. Fambrough - Jr.)

Componentele histonelor (după Luck şi Fambrough)	Sinonimele (după Butler, Cruft)	Mobilitatea relativă electroforetică	Aminoacidul N-terminal	Aminoacidul C-terminal	Asemănările
Timus I, *ab*	*f*1, alfa	slabă	blocat	Lys.	Histone bogate în lizină, cu 28% Lys., 24% Ala, 10% Pro., 1% Tyr. şi Phe., fără Met. Microheterogenitate. Mazărea are His.
Mazăre I, *abc*		slabă	blocat	Lys.	
Timus II b_2	*f*2*b*, gamma	intermediară	Pro.	Lys.	Mai puţină histonă bogată în lizină (17% Lys), 7% Arg. Timusul are Ser. multă.
Mazăre II a_2		intermediară	Pro.	Ser., Ala	Mazărea are două componente
Timus II b_1	*f*2*a*2, beta	intermediară	blocat	Lys.	Puţină histonă bogată în lizină, 11% Leu., 1% Gly., Lys./Arg. = 1,2
Mazăre II *b*		intermediară	blocat	Ala.	Aceeaşi compoziţie aprox. dintre aminoacizii celor două histone
Timus III	*f*3, beta	histonele formează complexe	Ala.	Ala.	Histone bogate în arginină, cu E-metil, Lys., Cys., 11% Glu.
Mazăre III		idem	Ala.	Ala.	Toţi aminoacizii sînt asemănători, ca şi peptidele, atît în timus cît şi în mazăre
Timus IV	*f*2*a*1, beta	directă	blocat	Gly.	Histone ce conţin multă Arg., 17% Gly., 2% Pro. Toţi aminoacizii prezenţi sînt comparabili, avînd acelaşi fel de peptide.
Mazăre IV		directă	blocat	Gly.	

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 11

CREȘTEREA CELULARĂ

În cadrul dezvoltării unui organism, diferitele țesuturi care, în ontogeneză, sînt toate de tip proliferativ își modifică ulterior profund ritmul de diviziune astfel că potențialul mitotic se schimbă sau dispare. Cele mai multe țesuturi își pierd capacitatea de proliferare în stare adultă, unele însă, păstrînd o subpopulație celulară, pot asigura regenerarea țesutului respectiv, iar altele au o mare capacitate de creștere în tot cursul vieții.

B. Messier și C. Leblond clasifică țesuturile, după potențialul lor mitotic, în trei tipuri : *1*) țesuturi de tip static ; *2*) țesuturi cu capacitate de regenerare și *3*) țesuturi cu capacitate proliferativă.

Începînd cu segmentarea oului și pînă la stadiul adult toate țesuturile cresc prin hiperplazie, iar după acesta țesuturile statice cresc în volum prin hipertrofie, aceste țesuturi caracterizîndu-se printr-o puternică diferențiere fiziologică, celelalte țesuturi, și într-o măsură mică cele proliferative, continuînd să crească și să se dezvolte prin hiperplazie.

Țesuturile de tip static. De exemplu, țesutul nervos și țesutul muscular striat sînt formate din celule bine diferențiate, cu o durată de viață aproximativ cît a individului și care și-au pierdut capacitatea de a se divide.

Țesuturile cu capacitate de regenerare. Dintre acestea, epiderma sau mucoasa uterină a primatelor are o subpopulație de celule care își mențin potențialul mitotic. Aceste celule care formează „zone proliferative" sînt imature și nediferențiate ; ele, înlocuind celulele bătrîne, se diferențiază și apoi mor, fiind înlocuite la rîndul lor.

P. Brien a constatat că o hidră de apă dulce înmugurește timp îndelungat, dacă este menținută la temperatura constantă de 18°C, hrănită și dacă i se împrospătează apa. În acest timp ea crește printr-o zonă de proliferare subapicală, celulele îmbătrînite fiind eliminate prin polul bazal al polipului. Într-o lună și jumătate, toate celulele hidrei sînt reînnoite datorită celulelor *interstițiale* care au capacitatea de a se diferenția în toate tipurile de celule și anume în celule epiteliomusculare, senzoriale, cnidocișți, protoneuroni și celule germinale. Prin iradierea cu raze X a hidrei, celulele interstițiale sînt distruse în primul rînd, astfel că hidra nu mai crește și moare după cîtva timp.

Țesuturile de tip proliferativ. Își păstrează într-o anumită măsură potențialul mitotic, deși celulele lor sînt diferențiate.

La țesutul hepatic sau la măduva roșie a oaselor, paralel cu diferențierea, au loc și diviziuni. Neuroblaștii din parenchimul turbelariilor,

Scanned with OKEN Scanner

caracterizați printr-o sinteză intensă de proteine structurale, au rolul de a regenera țesuturi și organe formînd un blastem de regenerare în regiunea respectivă. Neuroblaștii formează un stoc permanent de celule de rezervă în aceste organisme.

La hidrozoarele gimnoblastice (de exemplu, la *Clava*) regenerarea gonoforilor în urma secționării lor sub coroana gonopodială nu se datorește celulelor de rezervă ci unor celule diferențiate care, în lipsa controlată a unei mitoze, determină cicatrizarea rănii. După o anumită diferențiere diviziunile celulare reapar. Astfel, după ce are loc diferențierea miofibrilelor, dispariția secreției, apariția ergastoplasmei dintr-un material ectodermic, ia naștere un strat bazal de celule interstițiale din care se organizează gonoforii.

În unele cazuri, împărțirea țesuturilor în aceste trei categorii nu se poate aplica : mușchii netezi, care par să fie țesuturi statice, fiind plini cu miofilamente contractile se pot divide în uterul gestant. În cazul regenerării membrelor la amfibieni, unde celulele cartilaginoase și musculare se diferențiază în celule mezenhimale, are loc o rediferențiere care duce la regenerarea țesuturilor membrului amputat. La urodele se pot regenera sub diferite influențe, dar cu participarea în primul rînd a sistemului nervos, structuri foarte specializate cum ar fi retina, nervul optic, cristalinul și irisul.

Fenomenele de diferențiere, trecerea la starea de nediferențiere urmată de rediferențiere și care după Studițki sînt foarte des întîlnite, au dat naștere la numeroase controverse. Astfel de fenomene se produc în degenerescența waleriană unde celulele Schwann se diferențiază în fagocite care se divid ; în perioada de regenerare a planariilor, glandele vitelogene se transformă în celule migratoare ; creierul vertebratelor completează lipsa substanțelor prin proliferarea nevrogliei și a elementelor din piamater.

J. Ebert, Y. Croisille, G. Tenlote, W. van Dooremaalen au folosit, pentru a urmări apariția și localizarea proteinelor specifice în cursul dezvoltării embrionare, metode imunofluorescente. Folosind anticorpi fluorescenți au observat că miozina se localizează în banda *A*, iar actina în banda *I* a miofibrilelor. Tratamentul cu seruri antimeromiozinice *H* și *L* a arătat că regiunea globulară a moleculelor de miozină este așezată lîngă linia *M* din banda *H*, iar regiunea fibroasă se întinde în restul benzii *A*, în direcția *I*.

În ce privește mecanismul contracției musculare, A. Szent-Györgyi și H. Holzer (1963) au arătat că banda *A*, văzută în fluorescență după tratare cu seruri de antimiozină și antimeromiozină *H* și *L* în timpul contracției, se scurtează în momentul în care banda *I* este foarte vizibilă. Această observație confirmă ideea că materialul benzii *I* alunecă pe materialul benzii *A* încît mecanismul contracției rezultă din deplasarea miozinei localizată în partea centrală a benzii *A*.

În timpul dezvoltării embrionare la găină, miozina cardiacă apare după 12—15 ore de incubație în tot epiblastul, iar cînd se formează prelungirea cefalică se localizează la nivelul primordiilor inimii. În acest stadiu de apariție al prelungirii cefalice s-a detectat actina care trece și ea în aria prezumtivă a inimii. Proteinele contractile s-au putut detecta

Scanned with OKEN Scanner

în somite abia în momentul diferenţierii miofibrilelor, primele fiind cele striate urmate de filamentele omogene.

În timpul diferenţierii miofibrilelor, trei componente specifice au fost observate la microscopul electronic: filamentele de miozină, filamentele de actină şi materialul benzilor *Z*. Cînd s-au folosit anticorpi fluorescenţi antimiozinici, aceştia se fixează iniţial uniform pe miofibrila tînără şi, după cîteva ore, pe banda *A* a acestora.

Deci, atunci cînd în celule apar produşi de sinteză specifici cum ar fi actina, miozina, rodopsina, hemoglobina, keratina, ca urmare a diferenţierii lor, ţesuturile formate din aceste celule sînt statice, lipsite de potenţial mitotic; cînd celulele elimină produşii sintetizaţi (hormoni, enzime, anticorpi etc.), ţesuturile proliferative alcătuite de ele îşi menţin potenţialul mitotic.

În general, rolul mitozelor constă fie în reorganizarea structurilor celulare (de exemplu, reorganizarea mitocondriilor şi aparatului lui Golgi în spermiogeneză), fie în dezorganizarea structurilor celulare, cum se întîmplă în procesul de regenerare a ficatului, cînd au loc transformări mitocondriale în timpul diviziunii hepatocitelor. Acest ultim rol explică lipsa diviziunii neuronilor adulţi care ar duce la dezorganizarea activităţii nervoase a întregului organism.

Reglarea diviziunilor celulare are loc prin mai multe mecanisme: *a*) mecanisme care realizează o autoreglare tisulară; *b*) mecanisme de heteroreglare tisulară; *c*) mecanisme de control prin retroinhibiţie şi *d*) mecanisme de control prin produşi metabolici tisulari.

Mecanismele care realizează o autoreglare tisulară au la bază faptul că există la mamiferele adulte un control homeostatic al dinamicii echilibrului celular exprimat printr-un raport constant între celulele nou formate, celulele care cresc şi celulele care mor.

Controlul proceselor de proliferare se realizează în acest caz fie printr-un control genetic, fie printr-un control epigenetic al produşilor tisulari specifici.

Controlul epigenetic al mitozelor. W. Bullough (1963—1965), bazîndu-se pe faptul că orice modificare în biosinteza proteică duce la o modificare la nivelul genelor şi că diviziunea unei celule este strict determinată genetic, a dovedit existenţa unor „substanţe de tip glicoproteic" numite generic *chalone,* care reglează potenţialul mitotic prin represia sau activarea genelor ce determină fenomenele de proliferare. Activarea sau represia acestor gene este determinată de concentraţia chalonelor din ţesut, care acţionează ca activatori într-o concentraţie mică şi ca represori în concentraţie mare. S-au putut extrage din unele organe substanţe cu efect inhibitor specific al mitozei, astfel că se presupune existenţa unor chalone specifice pentru fiecare ţesut cu structuri mai mult sau mai puţin asemănătoare şi într-o anumită cantitate, deoarece formarea lor are loc sub control genetic.

Chalona din epidermă, un produs omogen la ultracentrifugare, cu o greutate moleculară de 40 000 şi care este un complex glicoproteic (65% aminoacizi, 20% glucide, 15% apă), se găseşte în concentraţie maximă în celulele dintre stratul spinos şi stratul granular. Inhibarea formării chalonei poate fi provocată prin leziuni la nivelul unei singure celule, sau prin prezenţa în celulă a unor substanţe eliminate din lizozomi. Un rol

Scanned with OKEN Scanner

în menținerea unei anumite concentrații de chalonă în celulă îl are hormonul tiroidian care, crescînd presiunea la nivelul membranei lizozomale, inhibă eliminarea enzimelor lizozomale. Ca urmare, procesul de creștere sau scădere a concentrației de chalonă duce la proliferarea țesutului respectiv. Adrenalina formează un complex instabil cu chalona, avînd o activitate puternic represoare a diviziunilor celulelor epidermice. Deși nu există dovezi directe, se presupune că și hormonii tiroidieni formează complexe cu chalonele tisulare.

Mecanismul genetic al controlului mitotic a fost studiat de Bullough. Folosind celule epidermice de șoarece, a observat că celulele adulte sînt lipsite de potențialitățile avute inițial de genomul lor, ele fiind pierdute sau mascate. Potențialitățile permanent active sînt dirijate de un grup de gene care duc la sinteza enzimelor esențiale ale celulei. Potențialitățile care sînt în stare activă în celulă, dar nu se exteriorizează mereu, sînt sub controlul a două categorii de gene care acționează alternativ, unele conducînd sinteza proteică necesară proliferării celulare, iar altele sinteza produsului specific, keratina.

În proliferarea celulară sinteza proteică se realizează în profaza timpurie, fiind oprită în faza *S* de sinteză a ADN și în timpul mitozei și reîncepe în G_2. Controlul sintezei proteice este realizat de gene cu ajutorul *m*-ARN.

Într-o populație de celule epidermice există celule *imature* (*I*), celule *mature* (*M*), dar care prezintă capacitatea de a se divide și celule *pigmentate* (*D*) lipsite de potențial mitotic. Celulele *I* și *M* produc o mare cantitate de *m*-ARN pentru realizarea funcțiilor lor. Aceste celule, dacă sinteza lor este blocată sau scăzută, devin nefuncționale, imature și sintetizează un alt tip de *m*-ARN care determină mitoza celulei.

W. Bullough a dovedit experimental că scăderea concentrației chalonei sub un punct critic, ca în cazul leziunilor, duce la apariția celulelor imature capabile de diviziune. În urma unor leziuni repetate în cazul epidermei, crește activitatea mitotică, iar ciclul mitotic se reduce de la 30 de zile la 12 ore prin micșorarea duratei profazei și, paralel, celulele mature devin imature divizîndu-se intens. Atunci cînd concentrația de chalonă crește ca în cazurile de stress, frecvența mitozelor scade la un sfert din valoarea normală, iar durata de viață a celulei crește de la 1 lună la 4 luni.

Deci mitoza este controlată atît de genele implicate direct cît și de „microclimatul tisular" (chalone, hormoni tiroidieni, adrenalina și toți factorii controlului epigenetic care condiționează activitatea genelor).

Heteroreglarea tisulară. Unele țesuturi sînt active din punct de vedere fiziologic numai în anumite perioade și, în acest caz, reglarea proceselor de proliferare se face cu ajutorul hormonilor, avînd loc o heteroreglare, deoarece aceste țesuturi intră în diviziune sub acțiunea hormonilor elaborați de alte țesuturi. Un exemplu în acest sens îl constituie țesutul reproducător care proliferează numai în prezența hormonilor androgeni și estrogeni, hormoni specifici. Acțiunea hormonilor și în aceste mecanisme se manifestă tot la nivelul genelor. Cercetări asupra cromozomilor giganți de la diptere și asupra modificării lor sub acțiunea unor hormoni sexuali au dovedit acest lucru.

Scanned with OKEN Scanner

După Bollough, capacitatea hormonilor de a determina proliferarea unui țesut depinde de gradul în care hormonii pot neutraliza chalonele antimitotice care sînt prezente în aceste țesuturi în stări fiziologice normale.

Mecanismul de control prin retroinhibiție a fost sugerat în urma observațiilor lui A. Glinos și G. Gey. Folosind ser sanguin de la șobolan adult, creșterea hepatocitelor „in vitro" și a explantelor de ficat este inhibată, însă serul provenit de la șobolani hepatectomizați are o acțiune inhibitoare mai scăzută. Inhibarea mitozelor depinde și de concentrația plasmei care, atunci cînd crește, duce la inhibare accentuată, iar cînd este diluată prin plasmoforeză duce la mitoze în ficatul adult. Ca urmare a acestor observații s-a presupus existența unor proteine în plasma extracelulară care au un rol direct în reglarea proliferării hepatocitelor după hepatectomie.

Concepția lui L. Hamilton în legătură cu mecanismul de represie a ADN-ului este în concordanță cu concepția anterioară și cu teoria că în cromozomii hepatocitelor din ficatul normal există o concentrație mai mare de inhibitori ai sintezei proteice, decît în hepatocitele din ficatul care regenerează. Prin hepatectomie sinteza proteică scade, deci scade și efectul inhibitor asupra mitozelor, ADN-ul devenind apt pentru replicare.

Experiențele lui M. Abercrombie cu hepatocite cultivate în monostrat au arătat că controlul creșterii și diviziunii celulare este afectat doar de mecanismele de retroinhibiție a mediului în care cultura celulară se dezvoltă. Între compoziția mediului și procesele metabolice ale celulelor există o interrelație *celulă — mediu — celulă* (retroinhibiție de mediu), care determină proliferarea. Cultura de hepatocite ajunsă în stadiul adult începe să sintetizeze proteine a căror concentrație crește și vor acționa ca represori ai ADN-ului, celulele pierzîndu-și capacitatea de diviziune. Dezechilibrarea mecanismului stabilit prin îndepărtarea unei părți din cultură va fi urmată de proliferarea celulelor, pînă ce echilibrul se restabilește.

Controlul prin produși metabolici tisulari presupune existența unor factori produși chiar de celule și care pot regla procesul de proliferare. Acești factori sînt elaborați în mod normal în celule. Se poate stimula proliferarea unui organ dacă se injectează intraperitoneal la șobolan un omogenat provenit de la acel organ. În acest caz, eliberarea unor factori din țesuturile necrozate produce diviziunea celulelor de același fel. Dacă se ligaturează un lob hepatic se produce ischemia și necroza sa, ceea ce va accentua fenomenul de regenerare hepatică; tot astfel, paralel cu necroza experimentală a glandei lacrimale orbitale externe de la șobolan, are loc creșterea potențialului mitotic în glanda omoloagă laterală.

Prezența factorilor care se eliberează prin necroză și care se „activează" în celulele vecine a fost presupusă mai demult. Unii dintre primii care au lansat această idee a fost R. Virchow. Termenul de „necrohormoni", care definește substanțele eliberate de celulă în urma necrozei și care acționează fie ca inhibitori mitotici în concentrații mari, fie ca stimuli în concentrații mici, a fost introdus în 1927 de W. Caspari. În 1933, F. Turck reia această ipoteză și confirmă existența unui factor celular cu rol dublu în funcție de concentrația sa, pe care-l denumește *„cytost"*.

Scanned with OKEN Scanner

Teoria reglării creşterii şi multiplicării celulelor prin produşi ai metabolismului tisular a fost susţinută şi de H. Tier în urma experienţelor sale efectuate la nivelul glandelor lacrimale de la şobolani. Folosind şocul termic pentru necroza glandei orbitale, care durează 1—7 zile, în restul glandei are loc o creştere a indicelui mitotic de la 3,2 ± 0,9 la 16 ± 5,3. Tot în timpul necrozei glandei orbitale externe are loc creşterea vitezei de încorporare a timidinei ^{3}H în celulele glandei omoloage laterale, de două ori faţă de martor.

Administrarea omogenatelor autologe de ficat la şobolani după hepatectomie duce, după 48 de ore, la o creştere mare a potenţialului mitotic, răspuns care variază după timpul de autoliză a fragmentului de ficat folosit pentru omogenat.

Creşterea eficientă a indicelui mitotic se obţine cu omogenate din fragmente autolizate timp de 24—48 ore. Acest fenomen prezintă şi specificitate tisulară, omogenatele influenţînd numai organele din care au provenit.

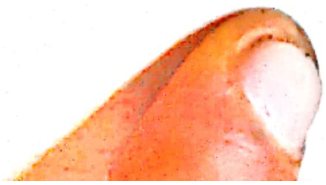
Necroza experimentală cu $CaCl_2$ stimulează regenerarea ficatului, prezentînd şi în acest caz specificitate de organ, deoarece proliferarea nu are loc în alte organe. J. Becker şi F. Stohlman, ca şi L. Linman şi F. Bethell afirmă existenţa unui factor umoral care stimulează formarea hematiilor, factor numit *eritropoetină*. Experimental, aceasta se obţine uşor prin 2—3 puncţii jugulare repetate la intervale scurte de timp, ultima puncţie conţinînd eritropoetina. Urmărind efectul acestui factor, A. Erslev a arătat că efectul ei începe cu iniţierea diferenţierii hemocitoblastului în eritroblaşti tineri, ca apoi influenţa ei să scadă la 10% în timpul diviziunii sau maturării eritrocitelor.

Unele experienţe, ca cele ale lui S. Fischer şi J. Fruhman (1964), prin care au urmărit încorporarea ^{54}Fe în hematii folosind preparate purificate, caz în care încorporarea nu a crescut ca atunci cînd s-a folosit eritropoetină nepurificată, au condus la ideea existenţei altor factori care determină modificările celulare. L. Linmann consideră că există cel puţin doi factori specifici care au o acţiune diferită şi anume : un factor *termolabil*, insolubil în eter, acesta fiind eritropoetina propriu-zisă şi un factor *termostabil*, solubil în eter şi care este de natură eritrocitară şi antichalonic.

Apariţia granulocitelor din măduvă în sînge are loc sub influenţa mai multor factori umorali cu condiţia comună ca, după 6 ore de la administrarea lor, să producă o granulocitoză puternică. Aceşti factori au fost denumiţi *inductori ai leucocitozei* (F.L.I.) sau *promotori ai leucocitozei* sau *granulopoetina*.

Cercetările lui C. Craddock arată că reglarea formării elementelor figurate ale sîngelui nu are loc numai în prezenţa acestor factori, ci şi sub influenţa inhibitoare a unei substanţe de tip glicoproteic produsă de granulocite şi asemănătoare cu chalona. Această substanţă, inhibînd sinteza ADN-ului, reglează cantitatea limfocitelor în sînge. În concluzie, factorii seriei de tip „proteic" acţionează doar ca declanşatori ai transformării celulelor nediferenţiate şi nu modifică viteza de maturare a acestor celule şi nici viteza şi cantitatea ADN-ului.

Timusul produce un număr mare de limfocite care, ajunse în diferite regiuni ale organismului, contribuie la creşterea şi înmulţirea celu-



Scanned with OKEN Scanner

lelor splenice, cărora le furnizează ADN-ul. B. Bryant, injectînd limfocite timice marcate de la șoareci tratați cu Td^3H-R altor șoareci care au fost hepatectomizați, a constatat autohistoradiografic că, după 28—30 ore, 70—80% din nucleii hepatocitelor și 90—95% din nucleii glandelor lui Lieberkühn sînt marcați cu timidină, deci ei folosesc ADN-ul limfocitelor pentru sinteza ADN-ului lor.

ADN-ul limfocitelor este utilizat și în procesele de cicatrizare ale epidermei. M. Landy și K. Fichtelicus au făcut experiențe cu limfocite din timus marcate cu ^{32}P și au găsit marcajul în nucleii celulelor epidermale. R. Hard și B. Kullgren au demonstrat că ADN-ul limfocitelor este transferat altor celule la nivel cromozomal.

În concluzie, ADN-ul limfocitelor din timus este reutilizat în sinteza ADN-ului celulelor care proliferează.

Experiențe de hepatectomie, urmate de regenerarea ficatului prin diviziuni rapide, au permis studierea factorilor care se interferează în acest proces. Astfel, s-a observat existența unei variații diurne a mitozelor în timpul regenerării ficatului, variații care determină cantitatea și conținutul proteic, cît și conținutul în ADN al ficatului. Același omogenat din ficat administrat dimineața duce la creșterea indicelui mitotic, iar după amiază și noaptea duce la scăderea masivă a mitozelor. A. Glinos presupune, pe baza unor experiențe, că este vorba de formarea unui complex inhibitor în cursul nopții în organele receptoare, iar ziua se formează un complex stimulator al mitozelor. Deci, preparatele din ficat recoltate dimineața vor produce o activare a mitozelor, iar cele din ficat recoltate seara o inhibare a mitozelor. În prezența serului provenit de la animale nehepatectomizate, culturile de fragmente de organe nu sînt influențate.

Acest fenomen are specificitate de organ, deoarece s-a văzut că explante de alte organe nu reacționează în prezența serului animalelor cu hepatectomie. Valoarea încorporării în ficatul cultivat este proporțională cu concentrația serului adăugat în mediu și depinde de starea metabolică a explantelor „in vivo".

Rezultă, deci, că factorul umoral este de natură tisulară, sintetizat în hepatocitele ficatului în regenerare și apoi eliberat în sistemul circular al organismului respectiv.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 12

CITODIFERENȚIEREA

Conceptul asupra celulei nediferențiate s-a format în urma cercetărilor amănunțite de microscopie fotonică prin care s-au analizat aspectele morfologice ale celulelor nediferențiate în comparație cu cele specializate. Deosebirile mari dintre cele două categorii de celule nu au putut fi încă detectate în totalitatea lor la nivel molecular sau genetic.

H. Holtzeer (1968) definește din punct de vedere biochimic celulele *diferențiate* ca fiind capabile de o sinteză în cantitate mare a unor molecule anumite, uneori neesențiale, pentru viața celulei. Toate celulele produc molecule de citocromi, de colesterol, de dehidrogenază succinică, de triptofan-sintetază, de glucozo-6-fosfatază, sau de diferite ARN. Aceste molecule sînt esențiale viabilității tuturor celulelor care le produc. În schimb, unele celule produc albumine, cheratine, hemoglobină, condroitin-sulfați etc., molecule care nu sînt esențiale pentru viabilitatea lor, după cum oocitele produc *m*-ARN sau *r*-ARN active sau represate în mare cantitate și care nu contribuie cu nimic la supraviețuirea imediată a viitoarelor blastomere. Astfel, rămîne să se studieze diferențierea ca un „filtraj" genic prin care se realizează sinteze și configurații macromoleculare specifice țesuturilor considerate.

Filtrajul genetic este realizat în primul rînd prin sinteza diferențială a acizilor nucleici și prin mitoză, fiind bine cunoscut faptul că o celulă care se divide nu se mai diferențiază. Oprirea diviziunii celulelor se face prin creșterea concentrației c-AMP, care stimulează ARN-polimeraza II în producerea *m*-ARN cu o serie de consecințe asupra modificărilor membranei plasmatice. Astfel, reglajul genetic care codifică modificările reversibile ale suprafeței celulare este legat de activitatea mitotică. Pătrunderea calciului în celulă determină, pe de altă parte, o creștere a c-GMP cu consecințe asupra sintezei ADN și asupra mitozei. Permeabilizarea membranei celulare pentru calciu este dată de o serie de substanțe (fitohemaglutinină).

I. Bell (1969) a descoperit așa-zișii *I-somi,* un ADN care migrează din nucleu în citoplasmă, unde se leagă de plasmalemă. Acest ADN de 18S reprezintă 2% din ADN-ul total al celulei și persistă în citoplasmă mai multe generații celulare. El nu este atacat de DN-aza nucleară și nu este afectat de inhibitorii replicării ADN nucleari. În schimb, transportul său din nucleu în citoplasmă este blocat de rifampicină. I-somii conțin 70% de secvențe mediu repetitive care sînt omoloage numai cu 4% din secvențele repetitive din ADN și 30% de secvențe unice care sînt

Scanned with OKEN Scanner

omoloage cu 11% din secvențele unice nucleare. Acești I-somi indică, după J. Kock (1973) și W. Meinke (1974), o stare de nediferențiere sau dediferențiere celulară.

M. Smulson (1970) a evidențiat o serie de condiții ale biosintezei proteice, reducînd de pildă aminoacilarea *t*-ARNs. În acest mod se realizează o scădere a sintezei ARN. Asistăm la o scădere a ribozomilor liberi, iar aminoacil-transferaza II care alungește lanțul polipeptidic se găsește în suficientă cantitate. În schimb, este inhibată reversibil sinteza ARNs [1] ribozomal. Dacă adăugăm însă aminoacizii care lipseau, se restaurează sinteza ARN cu condiția ca biosinteza proteică să fie deplină. M. Oravec (1974) crede că triptofanul stimulează sinteza *D*-ARN iar alfa-metiltriptofanul pe aceea a *r*-ARN. În plus, ARN-polimeraza I este stimulată de aminoacizi și în felul acesta crește cantitatea de precursori ribozomali nucleolari. Se poate vorbi deci de un raport între translație și transcripție, care reglează activitatea celulară și în primul rînd citodiferențierea.

R. Britten și E. Davidson (1969—1975) au elaborat un model al reglajului transcripției la eucariote, care ține cont de o serie de observații făcute asupra activității moleculare a nucleului : de pildă, existența ADN repetitiv la eucariote și al unui angrenaj de asemenea secvențe cu altele unice ; efectul pleiotrop al majorității agenților derepresori ; o serie de secvențe transcrise în nucleu dar care nu ies în citoplasmă, ca și faptul că reglajul expresiei genice la eucariote se face la nivelul transcripției. În cadrul acestui model sînt patru categorii de gene :

1) gene *sensor*, care sînt stimulate de agenți inductori (hormoni, substanțe inductoare embrionare, substanțe elaborate de diferite organe adulte etc.). Ele sînt asociate cu proteine specifice, care sînt programate să recepționeze inducția ;

2) gene *integratoare*, situate lîngă sensori și care sintetizează activatorii de natură proteică. Aceștia din urmă pun în funcție genele receptoare ;

3) genele *receptoare*, odată activate, permit transcrierea genelor producătoare învecinate ;

4) genele *producătoare* sintetizează ARN-uri mesagere monocistronice (fig. 141).

Genele sensor și integratoare sînt dispuse una lîngă alta, ca și genele receptoare și producătoare.

Același activator elaborat de genele integratoare poate stimula mai multe gene receptoare așezate pe alte porțiuni ale cromozomului. Cum fiecare genă producătoare are și una receptoare pentru acest activator, este logic ca genele receptoare să formeze în ansamblu un ADN repetitiv alternativ cu ADN unic al genelor producătoare. Activatorul proteic poate naște proteine acide nucleare, dar „recunoaște" mai puțin specific receptorul. Genele integratoare nu sînt repetitive deoarece proteine asemănătoare pot fi sintetizate pe secvențe destul de diferite datorită mutațiilor celei de a treia baze a codonului sau că (poate) aceste proteine acide activatoare vin din citoplasmă. Asemenea considerente l-au făcut

[1] ARNs = acizi ribonucleici nou sintetizați în nucleu.

Scanned with OKEN Scanner

pe G. Georgiev (1972) să scoată genele integratoare din modelul propus de el. După Georgiev, şi eucariotele au *operoni* în cromozomii lor care transcriu. Amintim că operonul este o unitate genetică formată din mai multe gene alăturate, care funcţionează coordonat sub acţiunea operatorului. Or, pe operon ia naştere un ARN a cărei extremitate 5'-trifosfat este mare şi de natură repetitivă ; ea joacă tocmai rolul de reglator. Extremitatea 3'-OH, fiind compusă din secvenţe unice, are ataşate fragmente de *poly* (*A*) în etapa după transcriere. Aceste secvenţe unice constituie partea informativă a ARN nuclear, care trece în citoplasmă fără secvenţele repetitive care rămîn în nucleu. Extremitatea 5' reprezintă genele receptoare. Fracţia histonelor f_1 represează genele reglatoare şi specificitatea este dată de proteine.

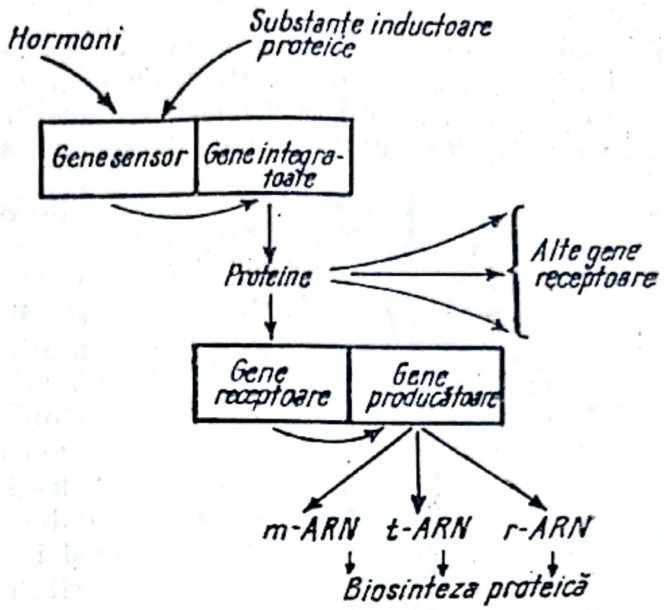


Fig. 141. Modelul reglajului genelor din celula eucariotă (după R. Britten şi E. Davidson).

Acetabularia a constituit pentru J. Hämmerling şi J. Brachet (1932) materialul favorabil descifrării interdependenţei dintre nuclei şi citoplasme, care să permită fundamentarea unei *teorii moleculare a diferenţierii.* Acest dasicladaceu mediteranean este o algă unicelulară de 4—5 cm, care se pretează foarte bine experienţelor de merotomie. (În astfel de experienţe se elimină nucleul care se află la baza tijei).

Alga este formată dintr-un sifon axial (cu diametrul de 2—3 zecimi de milimetru), un verticil ramificat dichotomic la partea superioară, iar la partea inferioară unde se află şi nucleul celula se ramifică sub forma unor rizoizi. În momentul fructificării, la partea superioară se formează o „pălărie reproducătoare" de 1 cm Ø, cu 100 de raze ce conţin chişti. În sifonul axial există o vacuolă enormă centrală, astfel că citoplasma se reduce la o peliculă fină în jurul peretelui tare. În această citoplasmă se află : mitocondrii, dictiozomi, picături de lipide şi plastide (fig. 142).

Aceste organite sînt mult mai dese în jurul nucleului şi mai rar spre apex unde are loc creşterea celulei. Apexul este bogat în ARN şi polizaharide acide. De asemenea, alga conţine cloroplaşti cu lamele de clorofilă fără grana. Glucidele ocupă aproape tot cloroplastul din regiunea rizoizilor şi, pe măsură ce ne apropiem de apex, cantitatea glucidelor se reduce la cîteva granule, cloroplaştii devenind din ovoizi filamentoşi. Vacuola centrală conţine acid oxalic, H^+, fructozani solubili, meta- sau polifosfaţi. Nucleul sferic, de 100 μ Ø, are un nucleol caracteristic, rami-

ficat și mare, ceea ce atestă o amplificare genică a *r*-ARN ; în nucleoplasmă se întîlnește o cromatină puțin abundentă. Acest nucleu se mai numește și *primar* sau *trofic* (fig. 143). Nucleolul său încorporează adenina — ^{3}H, acidul orotic — ^{3}H și uridina — ^{3}H, metionina — ^{35}S și ^{32}P, ceea ce atestă că el este locul de sinteză al ARN-ului și a unor proteine. Dealtfel, se poate detecta histochimic eliminarea unor ribonucleoproteine din nucleu, cînd alga este ținută la întuneric, sau în prezența RN-azei ce distruge mai întîi ARN citoplasmatic. Apoi, dacă alga este readusă 5 zile la lumină, sinteza ARN continuă. La algele crescute în întuneric nucleolul se fragmentează în 9 nucleoli și se pot detecta picături de ribonucleoproteine, atît în nucleu cît și în jurul lui. Menținerea la obscuritate vreme îndelungată are ca efect transformarea nucleului într-o sferă cu structură spumoasă și lipsită de activități elaboratoare. Scăderea în volum a nucleului, în care caz nucleolul devine slab bazofil, se poate realiza experimental prin mai multe

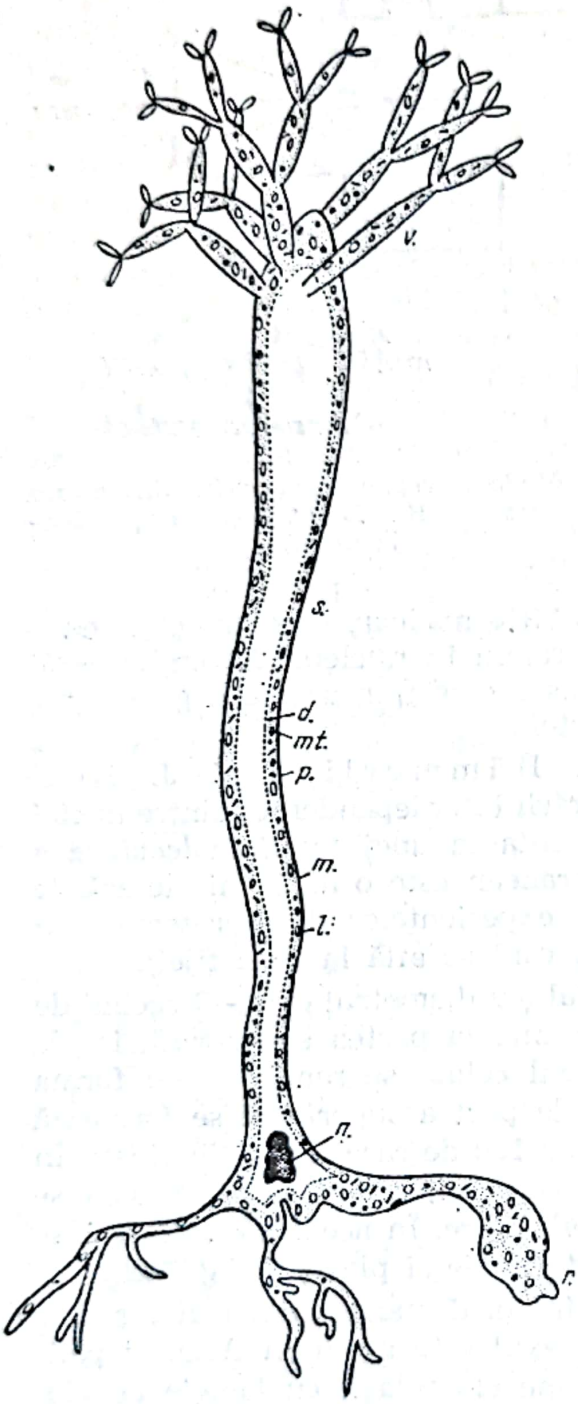


Fig. 142. Acetabularia mediterranea : *v.* — verticil ramificat ; *s.* — sifon axial ; *r.* — rizoid ; *n.* — nucleu ; *m.* — membrană ; *l.* — lipide ; *mt.* — mitocondrii ; *p.* plaste ; *d.* — dictiozomi.

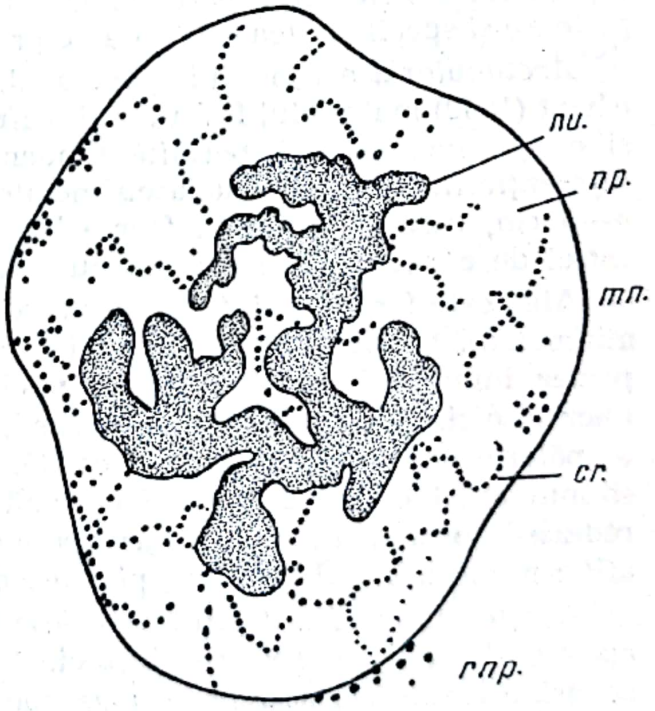


Fig. 143. Nucleul de la *Acetabularia :* *mn.* — membrana nucleară ; *np.* — nucleoplasmă ; *nu.* — nucleol ; *cr.* — cromatină ; *rnp.* — ribonucleoproteine.

Scanned with OKEN Scanner

căi (15 zile de întuneric, tratarea cu tripaflavină, inhibarea fosforilării oxidative cu dinitrofenol, tratarea cu raze ultraviolete sau streptomicină) care dovedesc că activitatea de sinteză este în funcţie atît de starea metabolică a celulei, cît şi de integritatea ADN-ului.

Nucleul primar se divide la un moment dat rezultînd numeroşi nuclei-fii şi particule cromatice nefolosite atunci cînd se formează pălăria fructiferă. Nucleii mici, secundari, formaţi la partea inferioară a sifonului, sînt antrenaţi de mişcările de cicloză spre pălărie. În cursul ascensiunii, diviziunile lor încetează. Apoi nucleii se plasează într-o citoplasmă bazofilă, capătă nucleoli, cresc, după care citoplasma bazofilă dispare şi se plasează în interiorul razelor pălăriei formînd chişti. La început chistul are un singur nucleu cu un nucleol, dar în scurt timp, prin cîteva diviziuni, se formează 20—40 „nuclei de hibernare", sau *zoizi.* Aceştia ies prin spargerea chistului şi pot să se dezvolte într-o algă. Ei se transformă în zoizi biflagelaţi mobili, care, ieşind în afară prin spargerea chistului, fructifică în apa de mare dînd o nouă algă. În alte cazuri, chiştii cuprind gameţi deosebiţi ca mărime (anizogameţi), prin a căror copulare rezultă o nouă algă.

Experienţele de merotomie ale lui J. Hammerling şi J. Brachet au arătat că în urma secţionării sifonului axial în numeroase fragmente acestea mor în cele din urmă, cu excepţia fragmentului bazal nucleat care este singurul capabil să regenereze întreaga algă. Dacă experienţele sînt efectuate pe alge tinere proaspete, atunci fragmentele anucleate sînt capabile să trăiască cîteva luni timp în care pot să crească şi chiar să producă verticile cu pălării sterile. Acest lucru este posibil datorită unor substanţe morfogenetice de origine nucleară repartizate în algă după un gradient apical bazal. S-a putut oprecia că avem de-a face cu ribonucleoproteine şi proteine — SH provenite din nucleu şi acumulate în timpul creşterii normale a algei în apexul său ; depinde de cantitatea acestor substanţe acumulate în apex ca fragmentele anucleate să diferenţieze mai multe sau mai puţine structuri. Dacă se secţionează o algă în momentul diviziunii nucleului bazal, atunci aceasta se opreşte din mitoză pînă cînd se reface pălăria.

Prin secţionări repetate se pot bloca în acest fel mitoze timp de doi ani. Dacă la un fragment anucleat vechi cu pălărie se grefează un rizoid nucleat tînăr, atunci acesta intră imediat în diviziune. În mod normal, diviziunea nucleului are loc trei luni de la formarea algei, dar, prin asemenea experienţe, se poate face ca nucleii să intre în diviziune după 15 zile. Există, deci, o influenţă reciprocă între citoplasmă şi nucleu.

Dacă se secţionează în două o algă tînără fără pălărie şi se tratează apoi cu ribonuclează, fragmentul apical degenerează neformînd pălărie, în schimb cel bazal nucleat regenerează formînd fructificaţii. Deci, enzima nu afectează capacitatea nucleului de a reface ARN-ul citoplasmatic pierdut, în schimb hidrolizează ARN-ul din apex făcînd imposibilă regenerarea pălăriei.

Într-o altă experienţă, s-a tratat alga cu actinomicină-D. Acest antibiotic inhibă trancripţia *m*-ARN pe ADN, aşa încît fragmentul nucleat nu mai regenerează, în schimb apexul plin de ribonucleoproteine, asupra activităţii cărora actinomicina nu are nici un efect, va forma o pălărie

Scanned with OKEN Scanner

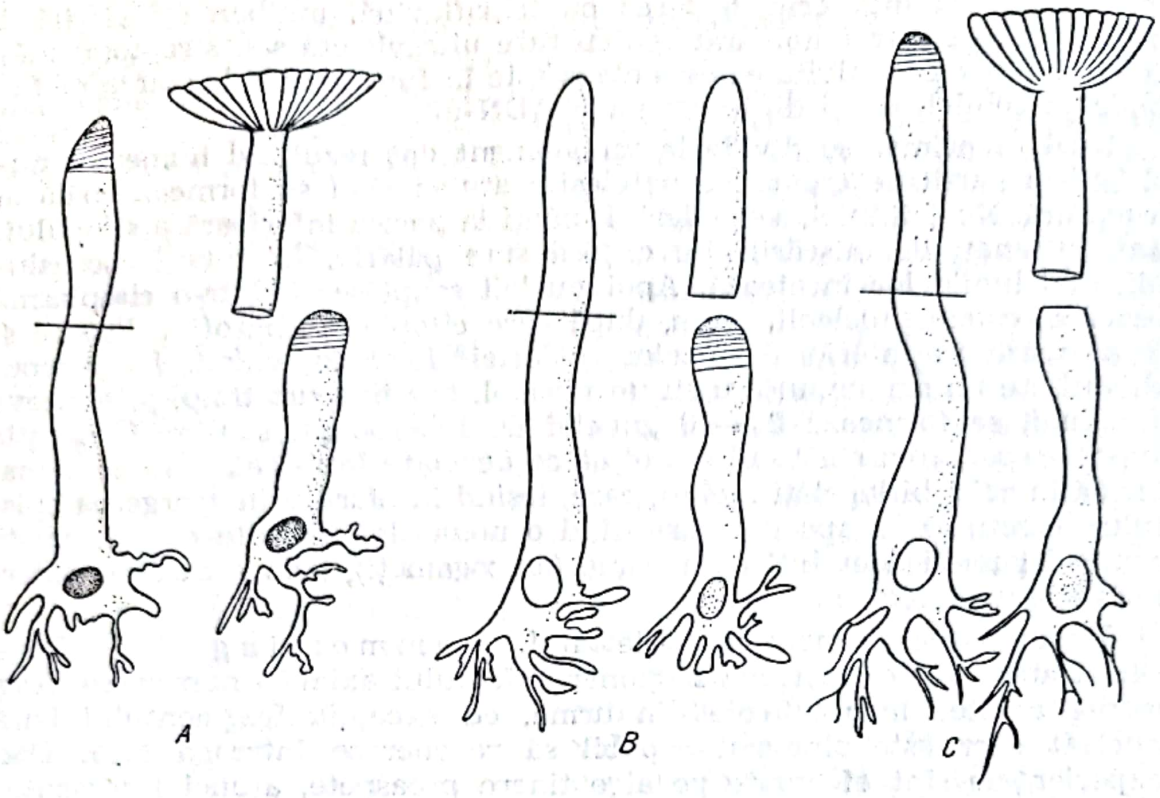


Fig. 144. Experienţele de merotomie făcute pe *Acetabularia* care dovedesc dependenţa diferenţierii de „substanţe morfogenetice" elaborate de nucleu, ca proteine SH şi ribonucleohistone, acumulate în apex :

A — algă care regenerează normal ; *B* — algă care, după tratarea cu RN-ază, nu mai regenerează o pălărie ; *C* — algă care, după blocarea replicării ADN, poate regenera pălăria pe seama substanţelor morfogenetice din apex (după J. Brachet).

(fig. 144). Microinjecţii cu actinomicină marcată au indicat pe autohistoradiografii localizarea ei pe cromozomi şi, în general, pe oricare ADN atît cromozomal cît şi citoplasmatic. Într-adevăr, tratamentul cu actinomicină alterează atît ultrastructura, cît şi ritmul fotoperiodic şi fotosinteza din cloroplaste. Actinomicina blochează şi sinteza ARN din cloroplaste, în consecinţă şi a proteinelor acestora.

Activitatea ADN din cloroplaste este independentă de aceea a ADN-ului nuclear, deoarece în fragmentele anucleate cloroplastele cresc ca număr, ceea ce dovedeşte autoreplicarea ADN-ului lor. Această creştere a cantităţii de ADN cloroplastic poate duce la dublarea sa în cazul algelor anucleate.

Marcarea unor fragmente anucleate cu ^{32}P a permis separarea prin cromatografie a diferite fracţii de ARN : *D*-ARN, ARN cloroplastic, ADN-ARN hibrid cloroplastic. Prin aceeaşi metodă aplicată fragmentelor anucleate s-a constatat că, în timp de 2 zile, din fragmente dispare ARN.

Problema sintezei ARN-ului în fragmentele anucleate a rămas un subiect de controverse : unele experienţe de dozaj a ARN-ului arată că

Scanned with OKEN Scanner

sinteza sa este complet abolită după anucleare ; alte experienţe, dimpotrivă, constată o creştere a ARN-ului citoplasmatic în fragmentele fără nucleu, cu condiţia ca ele să stea la întuneric 10 zile după secţionarea algelor şi apoi să fie repuse la lumină.

Analizîndu-se proporţia în baze a ARN-ului nucleilor s-a găsit că ea coincide cu aceea a ADN-ului, adică există un raport similar adenină-uracil sau timină-guanină-citozină la cei 2 acizi nucleici. Faptul acesta l-a făcut pe J. Brachet să considere ARN nuclear ca avînd un rol morfogenetic. Adăugîndu-se la mediul de cultură derivaţi halogenaţi ai pirimidinelor (5-fluorodezoxiuridină, 5-bromodezoxiuridină, 5-fluorouridină) în cantitate de 10^{-4} moli se inhibă formarea pălăriilor reproducătoare în fragmentele nucleate de *Acetabularia* ; în schimb, la cele anucleate inhibiţia este parţială.

Studiindu-se încorporarea ^{3}H-uridinei în prezenţa fluorodezoxiuridinei, s-a observat la martor un gradient apicalo-bazal de încorporare a uridinei, care lipseşte la algele tratate. Asemenea experienţe dovedesc că nucleul este acela care asigură existenţa acestui gradient de ribonucloproteine de natura unui *m*-ARN fie transformat, fie utilizat (în timp) de către citoplasmă.

Grefele intra- şi interspecifice vin să întărească această opinie. Alipirea a două fragmente bazale de *Acetabularia mediterranea* nucleate produc alge binucleate fertile, care fructifică o pălărie cu 72 de raze sudate şi fără pinten. Hibridarea a două fragmente nucleare de la două specii de *Acetabularia mediterranea* şi *A. crenulata* produce o pălărie perpendiculară pe locul de alipire. Pălăria are 32 de raze izolate libere, fără pinteni, caracteristică speciei *crenulata*. Chiar şi grefa a 2 fragmente anucleate de *Acetabularia mediterranea* şi *A. crenulata* produce pălării asemănătoare mai mult cu *crenulata*. Grefarea unui fragment nucleat de *Acetabularia mediterranea* la un apex anucleat de *Acetabularia crenulata* produce totuşi pălării cu unele caractere de *crenulata*.

Fenomenul se explică prin aceea că *m*-ARN din apexul fragmentului anucleat de la *Acetabularia crenulata* are o viteză de proteosinteză mai mare decît *m*-ARN-ul speciei de *Acetabularia mediterranea*. În sfîrşit, grefarea unui fragment binucleat de *Acetabularia crenulata* cu unul uninucleat de *Acetabularia mediterranea* formează pălării tipice de *crenulata* cu 52 de raze izolate şi ascuţite la vîrf.

Din aceste experienţe conchidem că forma pălăriei este dată de ARN nuclear şi că în asociaţii de grefe forma pălăriei este stabilită de *m*-ARN-ul cu viteza de proteosinteză cea mai mare, indiferent că provine de la nucleu sau este rămas în apex sub o formă „cu viaţă lungă“ (fig. 145).

Transplantul de nuclei a servit, în plus, la explicarea rolului nucleului în morfogeneză. Nucleul nu poate trăi izolat de citoplasmă. „In vitro“, nucleii de *Acetabularia* trăiesc 5′ şi pot fi inoculaţi în fragmente anucleate. Inoculînd nuclei în fragmente anucleate de 3 săptămîni a căror sinteză proteică este nulă, asemenea fragmente „întineresc“ crescînd şi reproducîndu-se normal.

Apexul unor asemenea fragmente regenerate prin grefă nucleară are o mai mare capacitate morfogenetică decît martorul. Vîrsta nucleului

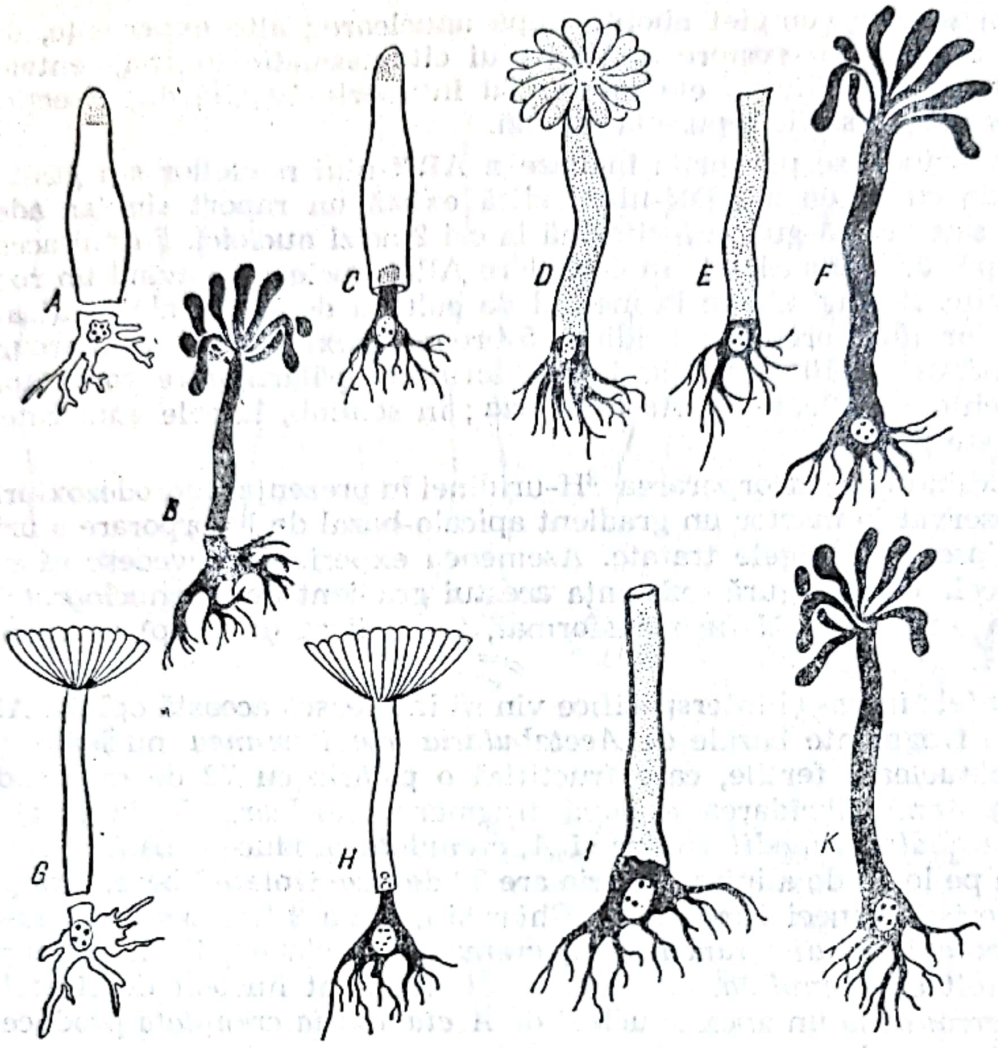


Fig. 145. Grefele interspecifice dintre *Acetabularia mediterranea* (albă) *(A)* şi *A. crenulata* (neagră) *(B).*

Nucleul de *A. crenulata* este transplantat în tija anucleată de *A. mediterranea,* cu un apex imatur ; se diferenţiază o pălărie hibridă care devine pur *crenulată,* abia după o a doua secţionare (*C, D, E, F*). Dacă nucleul de *A. crenulata* este grefat pe un sifon cu pălărie de *A. mediterranea,* regenerarea capătului este sub controlul exclusiv al nucleului (*G, H, I, K.*) (după R. Gross).

reprezintă, de asemena, o condiţie a regenerării. Nucleii bătrîni grefaţi în fragmente anucleate tinere recapătă brusc capacitatea de biosinteză a ARN-urilor, ceea ce denotă o strînsă interdependenţă nucleocitoplasmatică. Tot astfel şi consumul de oxigen merge paralel în fragmentul anucleat şi cel nucleat timp de 4—5 săptămîni, după care creşte în jumătatea care regenerează. Pe de altă parte, inhibiţia creşterii cu tripaflavină scade şi respiraţia în decurs de 4 zile. În schimb, fotosinteza este independentă de prezenţa nucleului datorită existenţei ADN-ului cloroplastic. Aşa se explică de ce în fragmentele anucleate se sintetizează clorofilă şi luteină, caroten, neoxantină, violaxantină, astaxantină şi carotenoizi. În lipsa nucleului se stochează zaharuri reducătoare şi nereducătoare, care, altfel, s-ar consuma furnizînd materialele energetice morfogenezei.

Scanned with OKEN Scanner

În timpul fotosintezei, s-a constatat încorporarea ^{32}P în nucleol și în granulele meta- și polifosfatice din vacuola centrală. Încorporarea ^{32}P în granulele fosfatice din fragmentele anucleate se continuă chiar pînă la 3 luni de la anucleare, aceasta atestînd faptul că metabolismul fosforului neorganic este independent de nucleu.

Activitatea auxinică produce o creștere a filamentelor chiar și în absența nucleului. Acizii indoxilacetic și naftalinacetic în concentrație de 10^{-5} g/1000 pot determina la fragmentele bătrîne anucleate apariția pălăriilor. Anuclearea are un efect foarte marcant asupra metabolismului azotului, asupra sintezei proteinelor și a ARN-urilor legate de ea. La început, în primele două săptămîni, atît la fragmentul anucleat cît și la cel nucleat proteosinteza este identică după care, bineînțeles, scade în fragmentul anucleat. Însă aceste constatări nu se prezintă ca o regulă generală deoarece proteinele citoplasmice se pot sintetiza timp de 20 zile în absența nucleului. În schimb, proteinele cloroplastelor din partea bazală a fragmentelor anucleate încetează de a se mai forma chiar din a 7-a zi de la merotomie. Acest fapt se explică prin aceea că la partea bazală a algei cloroplastele reprezintă simple rezerve, iar sintezele în ele nu mai au demult loc.

În fragmentele anucleate se acumulează azot solubil datorită creșterii cantitative a o serie de aminoacizi și a amoniului. Încorporarea ^{14}C provenit de la H $NaCO_3$ depinde și ea de fotosinteză, fiind de 2-3 ori mai mare în cloroplaste decît în ribozomi. În mod natural alga este capabilă să asimileze aminoacizii din apă datorită carbonului din glicocol. ^{14}C al glicocolului pus în mediul de cultură este încorporat 100% în ribozomi ca și în plastide, atît la lumină cît și la întuneric. Acest fenomen important arată că alga este capabilă să folosească pentru sintezele sale proteice lanțuri carbonate provenite fie de la fotosinteză, fie de la exterior. S-au putut obține alge verzi și cu fructificații, crescîndu-le în apă de mare cu un aminoacid sau o amidă, ceea ce vine în sprijinul acestor constatări.

Sînt unele experiențe care sugerează o sinteză de aldolază și fosforilază în fragmentele anucleate, localizarea enzimelor nefiind legată de un organit celular, mai mult chiar, aldolaza lipsește din fracția microzomală. În timp ce glicerofosfataza acidă nu se poate sintetiza în absența nucleului, invertaza se sintetizează mult timp de la anucleare. Toate aceste observații arată că o parte din proteine fie că sînt de structură, fie că au activitate enzimatică sînt elaborate în citoplasma anucleată și că acest lucru este posibil datorită existenței vîrfului apical al algei.

Capacitatea de proteosinteză a apexului durează 20 de zile după care scade rapid, putînd fi redresată printr-o nouă grefă de nucleu. Totuși, așa cum era de așteptat, în fragmentul anucleat se consumă cantitatea de ARN inițială, cu toate că timp de 2 luni el este capabil să încorporeze precursori cu ARN : acid orotic ^{14}C, adenină ^{3}H. Că această încorporare are loc în ARN se poate dovedi prin tratarea cu ribonuclează a unor asemenea fragmente anucleate, enzimă care abolește creșterea și morfogeneza. Dealtfel, este știut că o algă normală pusă într-un mediu cu ribonuclează nu mai sintetizează ARN, proteine, nu mai crește și nu mai fructifică.

Un rol important în morfogeneză îl au proteinele cu sulf. Astfel, etionina (10^{-3} ml) stimulează formarea pălăriilor la fragmentele anucleate,

Scanned with OKEN Scanner

iar mercaptoetanolul (1/300 ml) inhibă formarea pălăriilor, algele părînd a fi crescute în condiţiile unei lumini slabe sau a unei nutriţii deficitare. Şi invers, ditiodiglicolul (1/1000 ml) stimulează morfogeneza „umbrelelor" reproducătoare în fragmentele anucleate.

Tulburarea metabolismului proteinelor cu sulf prin tratarea cu SO_4 blochează atît creşterea cît şi morfogeneza atît la fragmentele anucleate cît şi la cele nucleate. De aici şi rolul important al acestor proteine cu sulf în morfogeneză, în special în formarea substanţelor membranare. ^{35}S se încorporează intens în aceste substanţe.

O menţiune specială trebuie acordată încorporării metioninei ^{35}S şi studiului efectuat prin autohistoradiografii. Din aceste cercetări reiese că apexul, care este regiunea cea mai marcată şi în acelaşi timp sediul creşterii şi morfogenezei, este capabil de încorporare timp de 7 zile, în cazul unui fragment anucleat, ceea ce dovedeşte activitatea metabolică intensă a proteinelor cu sulf. Nucleolul încorporează şi el de 10 ori mai multă metionină ca citoplasma. În algele lăsate o oră în metionină ^{35}S, apoi puse într-un mediu cu metionină obişnută 23 h, nucleolii sînt mai puţin marcaţi decît citoplasma a cărei radioactivitate este mărită. Acest fapt dovedeşte că sinteza proteinelor cu sulf are loc în nucleu, mai precis în nucleol, ca şi ARN-urile. Din nucleoli, atît proteinele cu sulf cît şi ARN-urile migrează în carioplasmă şi apoi în citoplasmă, concentrîndu-se în apex.

Din aceste experienţe reiese clar faptul că citoplasma anucleată de la *Acetabularia* are posibilitatea de a supravieţui un timp şi chiar de a realiza o morfogeneză. Comparîndu-se aceste capacităţi ale algei cu acelea ale fragmentelor de amibe sau stentori anucleaţi, ele sînt efectiv mult mai mari. Această mărire este datorită şi fotosintezei care are loc în fragmente în absenţa nucleului şi oferă energie citoplasmei. În plus, în fragmentele anucleate care nu au fructificat încă, se acumulează în apex ribonucleoproteine şi proteine cu sulf de origine nucleară. Tocmai aceste substanţe morfogenetice de origine nucleară ale lui J. Brachet conferă părţilor anucleate posibilitatea formării verticilelor şi a pălăriei.

Precursorii acestor substanţe provin din citoplasmă de unde trec în nucleu, concentrîndu-se în nucleol care devine sediul elaborării lor.

Studiul interacţiunilor nucleocitoplasmatice de la *Acetabularia* ne dă o imagine concretă asupra legăturii indisolubile dintre nucleu şi citoplasmă.

12.1. DIFERENŢIEREA GAMEŢILOR

Dacă concepem diferenţierea ca o sinteză a unor anumite substanţe în cantitate mare dar neesenţiale pentru viaţa celulară în general sau la un moment dat, trebuie să ne punem problema care este „programul" care dirijează aceste sinteze. Cum toate celulele conţin nuclei cu acelaşi patrimoniu genetic în cadrul unui individ, implicit trebuie să existe un mecanism de reglare a expresiei genice în cursul diferenţierii embrionare. Acest reglaj poate avea loc atît la nivelul transcripţiei, cît şi la nivelul traducerii mesajelor genetice.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a putea adînci mai uşor această complicată problemă, va trebui să menţionăm studiile făcute pe oul (zigotul) animalelor ; aceasta, pentru că oul fecundat este celula iniţială cu toate potenţialităţile de la care începe dezvoltarea unui nou organism.

Diviziunile repetate şi rapide din prima perioadă a embriogenezei, adică timpul segmentării oului fecundat, dau naştere la o serie de celule-fiice sau *blastomere* al căror rol este bine determinat într-un moment precis al dezvoltării ontogenetice. Apare, deci, o segregare în determinarea blastomerelor care înseamnă preludiul diferenţierii embrionare. Într-adevăr, blastomerele izolate ale unui ou de amfibian, de exemplu, au stări de determinare diferite şi, în consecinţă, vor prezenta potenţialităţi inegale în formarea unui primordiu de organe sau al altuia. Astfel, blastomerul ventral al oului de amfibieni, în stadiu de 2 blastomere, chiar după prima diviziune de segmentare, izolat experimental de cel dorsal, nu poate supravieţui. Ceea ce-i lipseşte este citoplasma corticală a blastomerului dorsal, marcată în mod natural la unele broaşte de o zonă cenuşie în formă de seceră, de unde şi numele de „seceră cenuşie" care i-a fost dat. Prin metoda marcărilor colorate s-a stabilit încă de mult la ce formaţie va da naştere fiecare arie de blastomere din blastula vertebratelor.

Dezvoltarea biologiei moleculare sugerează mecanismele prin care celulele embrionare dobîndesc facultatea de a selecţiona o parte din informaţiile genetice stocate în ADN-ul cromozomal al celulei-ou şi cum se traduc aceste mesaje în proteinele de structură ale celulelor diferenţiate, menţinînd această facultate în generaţiile diferitelor linii celulare.

Problematica actuală a diferenţierii celulare este mecanismul de „filtrare" a informaţiei genetice în celulele în curs de specializare. În ultimii 10 ani s-au putut aduce unele contribuţii asupra efectelor acestei filtrări, deoarece la capătul lanţului de transmisie ADN ⟶ ARN ⟶ proteine se pot detecta în primordiile organelor embrionare o serie de proteine specifice ţesuturilor pe cale de specializare. Aceste cercetări folosesc metodele imunologiei (J. Croisille, 1969).

O altă direcţie de cercetări este identificarea unor specii noi de ARN în embrion şi în primordiile de organe rezultate din foiţele embrionare. Această cale permite studiul direct al activităţii genice. Izolarea acestor ARN-uri a fost posibilă datorită perfecţionării metodei de ultracentrifugare în gradienţi de densitate şi prin hibridare moleculară.

Oocitele şi spermatozoizii animalelor reprezintă exemplul cel mai concludent al diferenţierii celulare ; celula-ou este relativ mare (de exemplu, gălbenuşul casuarului are 8,5 cm ∅), plină cu substanţe nutritive, imobilă şi înconjurată de tot felul de învelişuri. Spermatozoidul este mic, mobil datorită unui flagel extrem de lung şi cu o existenţă mai scurtă decît oul.

În ouăle care se dezvoltă înăuntrul ovarului se acumulează într-o perioadă, denumită „creşterea mare a oocitei", o serie de substanţe nutritive sau *vitelus*. Ele apar sub forme diferite : sfere, globule, plachete viteline etc. Natura chimică a vitelusului este fosfoproteică şi el este sintetizat în ficat sub acţiunea hormonilor estrogeni. Fosfoproteina hepatică sau *vitelogenina* este un complex constituit din două molecule proteice de *fosvitină* legate prin fier şi calciu de un dimer de *lipovitelină* la care se asociază *biliverdina*. Fosfoproteinele trec din ficat în torentul

Scanned with OKEN Scanner

circulator de unde sînt pinocitate de oocite : ele „se agață" prin grupările lor —SH de grupările —SH ale receptorilor membranari oocitari. Se formează legături —S —S — și vitelogenina pătrunde în oocită prin intervenția microtubulilor care o vehiculează. Apoi proteinele se acumulează în mitocondrii sau pur și simplu cristalizează în hialoplasmă.

La pești, amfibieni, reptile și păsări fosfoproteinele hepatice sînt sursa vitelusului oocitar ; la insecte acest vitelus provine din hemolimfă sau din celulele nutritive ovariene care aduc în oocite, în plus, și acizi nucleici exogeni.

Membrana oocitară prezintă microvili care se imbrică cu microvilii de pe fața oocitară a celulelor foliculare. Astfel ia naștere o *„membrană radiată"* de microvili, care au între ei mucopolizaharide ale glicocalixului membranei. Aparatul lui Golgi elaborează niște vacuole cu un produs glicoproteic, care la oocita matură migrează la periferie formînd vacuolele sau *granulele corticale*.

În oocitele foarte tinere citoplasma este plină de un material fibrilar ribonucleoproteic și abia mai tîrziu, în cursul vitelogenezei, apar ribozomii. Aceștia se dispun într-un gradient de polaritate care descrește de la polul animal spre cel vegetativ al oocitei, dar se acumulează și în jurul nucleului sau *veziculei germinative*, ca și sub membrana celulară sau *oolema*. Cam 90% din ribozomi sînt liberi iar 10% sînt poliribozomi sau ribozomi atașați de micile vezicule endoplasmatice.

Oocitele tinere sintetizează numai *t*-ARN 4S și *r*-ARN 5S și abia în cursul vitelogenezei, în vezicula germinativă se sintetizează *r*-ARN 28S și 18S, în continuare *t*-ARN, *r*-ARN 5S și *m*-ARN de diferite feluri.

În orice caz, bogăția de ribozomi și activitatea de sinteză a proteinelor de la polul animal confirmă concepția lui A. Dalcq și J. Brachet a *gradienților de polaritate*. Ribozomii fiind liberi, și în oocită existînd *toți factorii* necesari sintezei proteice în afară de mesageri, i-a sugerat lui J. Gurdon următoarea experiență : a injectat în oocite de *Xenopus* un *m*-ARN 9S al hemoglobinei de iepure, constatînd timp de 2 zile sinteza hemoglobinei de iepure. Sinteza are loc chiar și după anuclearea oocitei. Deci, în oocită, există de la începutul diferențierii sale tot ceea ce este necesar pentru sinteza proteinelor : aminoacil-*t*-ARN-sintetaza, factorii de inițiere, de alungire, de punctaj, *t*-ARN, ribozomi, în afară de *m*-ARN. Orice fel de „mesaje" ar fi injectate (*m*-ARN de cristalin, de imunoglobuline), oocita sintetizează proteinele respective. Procentul de proteine neosintetizate este de 35% ; restul de proteine sînt sintetizate pe baza mesajelor proprii. Biosinteza proteică crește apoi în cursul vitelogenezei, în sensul apariției unui set de enzime dintre care unele vor intra în funcțiune abia în gastrulație (protocolagen, hidroxilaza). Asemenea sinteze sînt preparative în acumularea a tot ceea ce este necesar pentru a face cu putință nutriția embrionului pînă cînd acesta va fi în stare să-și procure hrana din mediul extern.

Problema lizozomilor din oocite rămîne deschisă. Tot ceea ce se poate spune este că în afară de fosfoproteinele cristalizate în plachetele viteliene se mai găsesc enzime hidrolitice (o fosfatază acidă, o protează acidă, o fosfoprotein-fosfatază) ceea ce pledează pentru o identificare cu lizozomii.

Scanned with OKEN Scanner

Tot în plachete se mai află molecule liniare de ADN lungi de 12—16 μ în dublu helix, cu o renaturare lentă și parțială. El (ADN) provine din cromatina hepatocitelor și, ajuns în oocită, se leagă solid de fosvitină, rezistînd la dezoxiribonuclează.

ADN-ul vitelin reprezintă 65% din ADN-ul citoplasmatic, restul fiind ADN mitocondrial. El formează o rezervă de nucleotide, întrucît va fi digerat pînă la urmă de nucleaze, pentru edificarea cromozomilor în decursul mitozelor din perioada formării blastulei, cînd iau naștere circa 2500 de nuclei la amfibieni.

În oocitele tinere mitocondriile sînt puține la număr dar, odată cu creșterea oocitelor, și numărul mitocondriilor se mărește. La început mitocondriile sînt asamblate într-o masă — *nucleul vitelin* — alăturată nucleului dar, în timpul oogenezei, mitocondriile migrează după un gradient de polaritate animal-vegetativ. Mitocondriile conțin un ADN circular de 5 μ Ø cu 15000 perechi de baze care pot codifica circa 5000 de aminoacizi. Pentru aceasta au la dispoziție și *mitoribozomi,* cu o constantă de sedimentare de 58S pentru subunitatea mică și de 80S pentru subunitatea mare. ADN are cîte o genă pentru codificarea *r*-ARN de 13S al subunității mici și 21S al celei mari, precum și 15 gene care produc *t*-ARN mitocondrial. Factorii de inițiere sînt la fel ca cei bacterieni și ARN-polimeraza mitocondrială este blocată de rifampicină, ca și cea bacteriană. Mitocondriile se umflă la tratamentul cu bromură de etidiu, blocîndu-se sinteza ADN. Deci, mitocondriile prezintă caractere de adevărate bacterii datorită existenței inhibitorilor specifici sintezelor mitocondriale : bromura de etidiu pentru ADN, rifampicina pentru ARN, cloramfenicolul pentru blocajul sintezei proteinelor. Însă toți acești inhibitori nu afectează dezvoltarea embrionară, după cum nu au efecte represive nici asupra regenerării. Ceea ce este necesar în acest caz din activitatea mitocondrială este producția de ATP mitocondrial, fără de care dezvoltarea embrionară este compromisă.

I. Dawid și A. Blackler (1972) au demonstrat că mitocondriile embrionului provin de la mamă, adică de la ou, bazați pe particularitatea că ADN mitocondrial de la *Xenopus laevis* este diferit de cel de la *Xenopus müllеri* în privința secvențelor netranscriptive. Or, încrucișarea acestor două specii produce hibrizi care au mitocondrii cu ADN întotdeauna matern.

Nucleul oocitei este constituit din dubla membrană cu pori care include sucul nuclear în care stau cromozomii plumoși și un număr de nucleoli din ce în ce mai mare, pe măsură ce oocita se apropie de maturație. Numărul porilor membranei nucleare atinge la oocita anurelor 40 de milioane, și firește că ei favorizează schimburile nucleocitoplasmatice. Totuși, dacă injectăm în citoplasmă proteine mai mari de 18 000 GM, ele nu pătrund în nucleu. În schimb, din nucleu ies în fiecare minut 2,6 mol. de ribonucleoproteine ribozomale cu o greutate moleculară mai mare de un milion de daltoni. Probabil că enzimele nucleare măresc porii și polizomii juxtamembranari sintetizează proteine care-i închid. Oocitele se caracterizează și printr-o delaminare a membranei nucleare care produce, mai ales în citoplasmă, *lamele inelate,* o formațiune care pare să constituie membranele netede ale reticulului.

Scanned with OKEN Scanner

Cromozomii pahitenici ai oocitei sînt alăturați unei formațiuni compacte de ADN, de forma unui „coif" la amfibieni și la pești sau a unui corpuscul sferic la unele insecte. ADN-ul acestui corpuscul poate fi denaturat termic, pe lamă, în care caz hibridează cu *r*-ARN marcat și purificat. După înlăturarea excesului de ARN cu RN-ază, pe histoautoradiografii apare un marcaj puternic datorită hibridării ADN-ARN marcat. Dealtfel, corpusculul dă reacția Feulgen pozitivă și se colorează în albastru cu verde de metil-pironină, chiar și după digestia cu RN-ază, dovedind existența ADN-ului hibridat. I. Steopoe și M. Varo (1971) au descris asemenea „calote" și la pești (fig. 146).

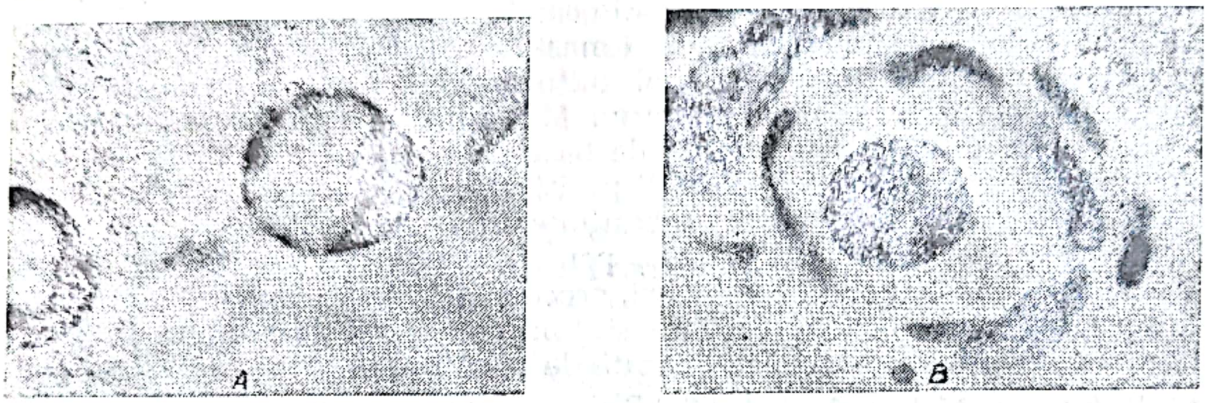


Fig. 146. Amplificarea genică la *Ctenopharingodon (A)* și *Acipenser ruthenus* (*B*) (reacția Feulgen) (după M. I. Varo).

J. Gall și M. Birnstiel (1968—1969) au arătat că ADN-ul „calotei" se hibridează specific cu *r*-ARN 28S și 18S, deci sînt cistroni (gene) ribozomali, adică un *r*-ADN. În contact cu această calotă se constituie primii nucleoli. După ce cromozomii încetează să se mai replice, genele *r*-ADN rămîn circa o lună grupate și continuă să se replice. Se ajunge astfel la peste un milion de copii ale genelor ribozomale în cadrul funcției de amplificare genică (*r*-ARN 28S și 18S) ; *r*-ARN 5S are genele localizate la extremitatea brațelor cromozomilor.

S-a apreciat că există circa 24 000 de copii ale genelor pentru *r*-ARN 5S, dintre care numai 13% transcriu efectiv, iar 87% rămîn *„tăcute"*, fiind gene *„spacer"*. Fiecare genă *t*-ARN este și ea repetată de 200 ori acumulîndu-se în pachete de gene separate între ele prin spații de gene *„tăcute"* sau *„separatoare"*.

Și astfel, la amfibieni, pești, păsări, cefalopode și reptile apar o mulțime de nucleoli periferici datorită fenomenului de *amplificare a genelor* pentru *r*-ARN. La oocitele ceva mai mari, nucleolii „se recunosc" pe viu ca niște corpi hemisferici de 1—5 μ Ø, strîns lipiți de suprafața internă a membranei nucleare.

Cu timpul, nucleolii cresc și se detașează de membrana nucleară. Odată cu contracția cromozomilor în „perie de lampă" și retracția buclelor laterale, nucleolii se desprind de membrana nucleară migrînd spre centrul nucleului. Această migrare este completă cînd oocita ajunge la maturitate și cînd o masă de nucleoli strîns uniți înconjoară cromozomii din mijlocul pronucleului femel.

Scanned with OKEN Scanner

La axolotul *Amblystoma mexicanum* nucleolii, la început mici și rotunzi, cresc și devin sferici de 10 μ Ø, apoi capătă un aspect neregulat, în substanța nucleolară apărînd și o vacuolă excentrică. Acești nucleoli se adună în grămezi și, legîndu-se unii cu alții, formează un inel (H. Callan, 1966). Fiecare din nucleolii „inelari" se întinde și spre centrul nucleului și, așa cum cromozomii „în perie" se contractă și se acumulează în centrul nucleului, tot așa nucleolii inelari se deplasează spre interior și se îngrămădesc în jurul grupului cromozomal. În final, fiecare nucleu își reia forma compactă, în general sferică. După Callan, tranziția formei nucleolare de la solidă la inelară și înapoi la solidă este o trăsătură constantă a oogenezei la axolot.

Nucleolii inelari care apar natural au fost descriși și la *Triturus viridescens* (N. Lone, 1967), ca și la *Plethodon cinereus* (Mac Gregor, 1965) și au fost observați în vezicule germinale la multe specii de urodele. Lungimea nucleolilor inelari este foarte variabilă, ca și aspectul lor (fig. 147). Mai mult, ei diferă după mediul în care au fost izolați, astfel că într-un mediu diluat apar lungi, subțiri, cu îngroșări de-a lungul lor, iar în mediu mai concentrat au aspectul unui șirag de mărgele constînd dintr-o serie de granule mari spațiate, de-a lungul unui filament axial mai subțire.

În mulți nucleoli cele două componente nucleolare, și anume componenta fibroasă și componenta granulară, sînt mai mult sau mai puțin amestecate, însă în nucleolii solizi, sferici din oocitele amfibienilor com-

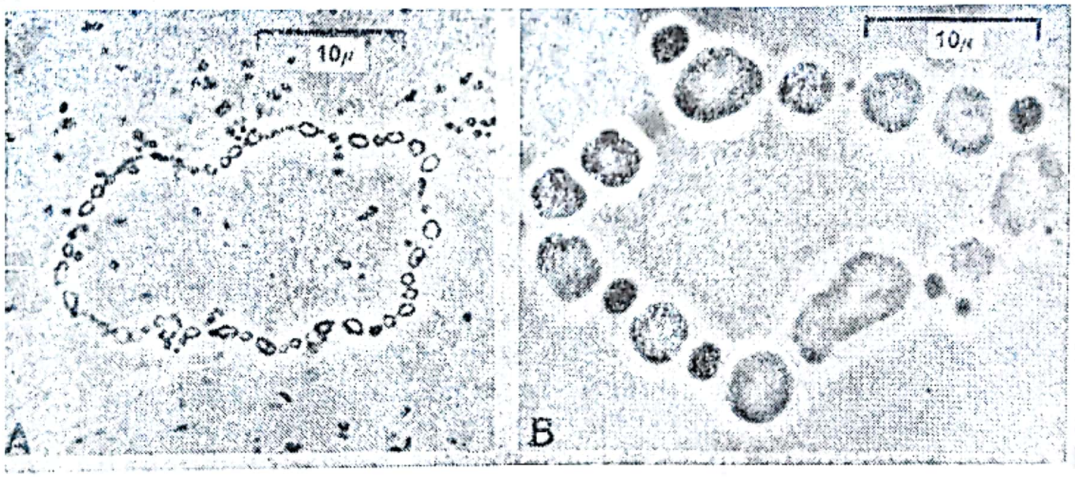


Fig. 147. Nucleoli inelari de *Eurycea bislineata (A)* și *Plethodon cinereus (B)* (după Mac Gregor).

ponenta granulară formează ca o coajă în jurul uneia sau a cîtorva mase sferice ale componentei fibroase (fig. 148) (O. Miller, 1966). Pentru acești nucleoli au fost introduși termenii „miez" și „cortex" și definesc aranjamentul componentelor fibroase și granulare una față de alta (Miller, 1962, 1966; Mac Gregor, 1965, 1967). Cortexul și miezul nucleolar pot fi ușor separați unul de altul folosindu-se fie veronal sodic neutru (Miller, 1963), fie acetat de amoniu 0,3 M (Mac Gregor, 1965). În acetat de amoniu se produce o ușoară desfacere a ambilor componenți, dar miezul și cortexul rămîn compacte și fiecare are un as-

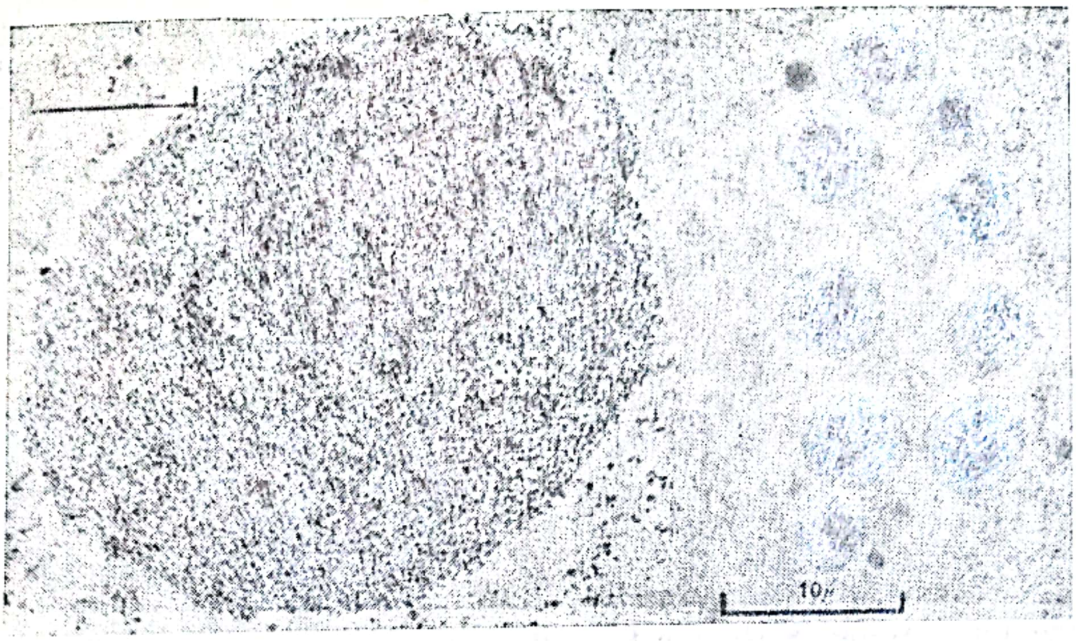


Fig. 148. Nucleol de la *Xenopus laevis* :
stînga — văzut la microscopul electronic ; *dreapta* — izolați și observați la microscopul fotonic. În amîndouă cazurile se distinge „miezul" de „învelișul" acestui tip de nucleoli (după Mac Gregor).

pect caracteristic în contrast de fază. Dacă nucleolii sînt izolați în acetat de amoniu mai diluat de 0,02M atunci cortexul se dezintegrează complet în cîteva secunde și miezul se dispersează pînă ce tot ceea ce rămîne este un mic inel granular. Aceste inele se consideră a fi corespunzătoare nucleolilor inelari care apar în mod natural în oocitele unor amfibieni.

În urma experiențelor nu s-a putut determina dacă există un raport strict între numărul miezurilor și volumul nucleolilor. Calculînd numărul de miezuri pe un nucleu, la 20 oocite luate de la 4 femele de *Triturus cristatus-cristatus,* s-a constatat că numărul miezurilor rămîne constant în oocitele mici, în cele mari și în tot stadiul oogenezei la care s-a făcut observația. Mac Gregor în experiențele sale a constatat că nucleolii oocitelor de la o largă varietate de amfibieni sînt cu miezuri multiple și situația găsită la *Triturus cristatus-carnifex,* unde cei mai mulți nucleoli sînt de dimensiuni uniforme și cu un singur miez, este neobișnuită. Cazul extrem cu miezuri multiple s-a constatat la oocitele de dimensiuni particulare de la broasca nord americană *Ascaphus truei.* Aici fiecare oocită conține numai cîțiva nucleoli foarte mari fiecare, care se dezagregă în acetat de amoniu în cîteva sute de grămezi de miezuri și o masă dispersată de cortex (Mac Gregor și Kezer, 1970). Deoarece nucleolii de *Ascaphus truei* apar ca structuri cu miez simplu, dublu, triplu și apar apoi ca niște corpi cu miezuri multiple, și fiindcă numărul miezurilor rămîne constant în toată faza cu cromozomi în „perie de lampă" a oogenezei, există un oarecare dubiu că nucleoli cu miezuri multiple apar prin fuziunea nucleară.

Distribuția miezului și cortexului în timpul formării și creșterii nucleolare, cît și aranjamentul acestor componente în nucleolii inelari solizi de la *Triturus viridescens,* au fost examinate la microscopul electronic de

Miller (1962) și Lane (1967). Conform acestor autori nucleolii oocitelor foarte mici constau aproape în totalitate din miez. Pe măsură ce nucleolul crește o pătură de cortex se formează în jurul miezului și creșterea în volum este atribuită acestui material cortical. După Lane și Mac Gregor (1967), miezul fibros este localizat excentric în nucleol, spre latura cea mai apropiată de învelișul nuclear. După Lane (1967), nucleolii inelari conțin un miez fibrilar central, care este continuu în toată lungimea lor, asemănător unui șnur care leagă mărgelele în șirag. Acest miez se presupune a fi încapsulat de un strat subțire de cortex. În experiențele autorului nucleolii inelari din oocitele de *Plethodon cinereus* (fig. 149) prezintă o organizare diferită. La ei distribuția mie-

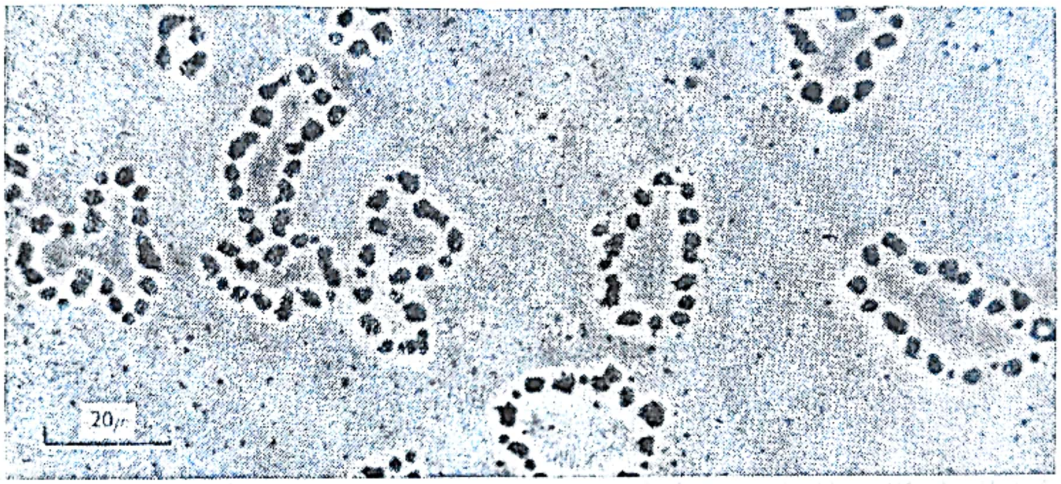


Fig. 149. Nucleoli inelari de *Plethodon cinereus* (după Mac Gregor).

zului nucleolar și a cortexului poate fi ușor văzută la un microscop interferențial, sau în preparate colorate cu gallocianin-cromalum. Fiecare „mărgea" apare ca un nucleol sferoidal în miniatură. Aceste miezuri sînt fiecare înconjurate de o masă sferică de cortex (v. fig. 148), dar, deosebit de situațiile descrise de Lane, în acest caz partea mai mare a nucleolului constă din material cortical. La nucleolii de tipul „șiragului de mărgele" de la *Plethodon cinereus*, firul de legătură este foarte subțire și, după opinia autorului (Lane), nu poate fi descris ca miez nucleolar.

Tot la amfibieni au mai fost studiate citochimia și funcția nucleolară. Din punct de vedere citochimic cantitativ, Mac Gregor și Moon (1971) au găsit că miezul și cortexul nucleolar conțin ARN legat de proteine bazice, concentrația acestor componente fiind mai mare în miez decît în cortex și proporția ARN față de proteinele bazice mai mare în miez.

În afara constituentului său principal ribonucleoproteic, fiecare nucleol oocitar de amfibian conține o mică cantitate de *r*-ARN. Aceasta a fost prima dată recunoscută ca „extracromatină", care apare în oocitele de la *Bufo* în timpul stadiului pahiten și care, mai tîrziu, se asociază la nucleolii care se multiplică (H. King, 1908). În 1942, T. Painter și A. Taylor au demonstrat prin tehnica Feulgen că cromatina observată de King a fost DNP.

Dovada concludentă a prezenței ADN în nucleoli a fost adusă în 1942 de O. Miller și J. Kezer. Astfel, Kezer constată că nucleolii inelari proaspăt izolați de tipul „șirului de mărgele" de la *Plethodon cinereus* s-au dezintegrat cînd au fost tratați cu dezoxiribonuclează, iar Miller a obținut rezultate similare cînd a izolat nucleolii de *Triturus pyrrhogaster* în mediu diluat și i-a tratat cu DN-ază. O evidențiere ulterioară a ADN-ului nucleolar a fost adusă de B. Elstein (1969) cînd a observat legarea actinomicinei-D (^3H) de nucleolii inelari și sferoidali din oocitele tinere, arătînd că acest component este localizat în miezul nucleolar. Nu s-a lămurit aranjamentul ADN nucleolar în interiorul miezului. Întrucît nucleolul este Feulgen negativ în timpul fazei cu cromozomi „în perie de lampă", aceasta indică faptul că ADN, care a fost compact și colorabil în stadiul timpuriu, s-a răspîndit în tot miezul ; iar faptul că ADN este în forma unui inel subțire este indicat prin aceea că un astfel de inel este tot ceea ce rămîne cînd miezul nucleolar este dezintegrat în mediul diluat.

Există îndoieli dacă componentul ADN al filamentului care leagă „mărgelele" într-un inel este în forma unui dublu helix total extins. Micrografiile electronice ale lui O. Miller și B. Beatty (1969) au arătat ce aspect are ADN-ul din miezurile nucleolare cînd este aproape total extins. Fibra axială are între 100—300 Å grosime și, cînd este tratată cu tripsină, grosimea ei se reduce la circa 30 Å.

Lungimea inelelor de ADN observate de cei doi cercetători variază de la 35 μ la 5 mm la *Triturus viridescens*. În 1966, O. Miller a descris o componentă membranară atașată de miezurile fibroase ale nucleolilor din oocitele de *Triturus viridescens* și *Triturus pyrrhogaster*, care apare cînd nucleii oocitelor de dimensiuni medii sînt izolați în tampon fosfat 0,1 M și apoi transferați în 0,025 M soluție salină pentru îndepărtarea învelișurilor. În aceste condiții, componenta membranară are un contrast redus, avînd 1—4 μ Ø și este atașată de miezurile fibroase. Dacă se adaugă sucroză 0,1—0,2 M la mediul de izolare, componenta membranară apare ca un filament care leagă o mică veziculă de miezul nucleolar. Miller a numită această componentă „membrană intranucleolară".

O componentă membranară analoagă a fost descrisă recent de J. Kezer, Mac Gregor și E. Schabtach (1971) în oocitele de *Ascophus truei* și *Plethodon cinereus*. La unele oocite mari de la aceste două specii toți nucleolii au cîte un filament care poate avea sau nu aspect de mărgea. Kezer a numit aceste filamente „cozi" nucleolare (fig. 150). Cozile sînt o trăsătură a nucleolilor care au părăsit membrana nucleară și au migrat în interior pentru a se îngrămădi în jurul cromozomilor din centru. Ele au o răspîndire destul de largă la diferite specii. Cozile nu au acizi nucleici detectabili citochimic și sînt distruse de către detergenți și enzime. Micrografiile electronice ale cozilor arată că ele constau din tuburi membranoase sau lanțuri de vezicule membranoase, care se termină lîngă sau în interiorul unei depresiuni de pe suprafața nucleolilor.

Marcîndu-se cu radioizotopi timp de 2 ore, apar radioactive numai miezurile nucleolare, dar dacă se continuă marcajul radioizotopii încorporează și cortexul.

Scanned with OKEN Scanner

Mac Gregor a arătat că nucleolii din oocitele mici au fost marcați uniform și aceasta probabil datorită faptului că acești nucleoli au aproape toți miez.

Marcajul nucleolilor inelari a fost studiat mai recent la *Euricea bislineata* (Mac Gregor și Kazer) unde lungimea inelelor variază și s-a putut urmări dacă rata încorporării uridinei —^{3}H pe unitatea de lungime a inelului a fost aceeași în inelele scurte ca și în cele lungi. Numărul granulelor de argint pe unitatea de lungime după incubații scurte a fost aceeași în inelele de 50 μ lungime ca și în inelele de 200μ lungime, deci lungimea aparentă a unui nucleol inelar este mai curînd o indicație a lungimii axului de ADN decît o indicație a gradului în care acel ax a fost extins sau contractat.

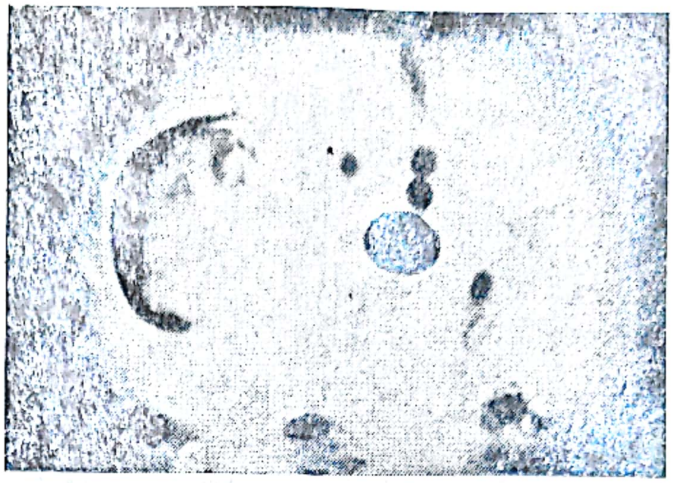


Fig. 150. „Cozile" nucleolare (după M. I. Varo).

O schemă privind funcția nucleolului oocitei amfibienilor a fost dată de Mac Gregor. Conform acestei scheme, în interiorul miezului nucleolar se află un singur filament circular de ADN, adesea cu lungimea de cîțiva mm. Segmente regulat spațiate ale acestui ADN au secvența de bază necesară pentru transcrierea moleculelor precursoare pentru *r*-ARN. Moleculele de ARN-polimerază sînt strîns atașate de-a lungul ADN. Fiecare moleculă de polimerază realizează transcrierea unei molecule de ARN 45S. ARN-ul nou format este imediat complexat cu proteine bazice și împachetat ca fibre de ribonucleoproteine care rămîn atașate prin molecula de polimerază de axa ADN sub un unghi drept. Polimeraza se deplasează de-a lungul segmentului transcris în care timp fibra se alungește. Ajunsă la capătul segmentului transcris, fibra se detașează de ADN și „cade" în necleoplasmă. ARN 45S este mai întîi clivat în ARN 30S și 18S (Gall, 1966). Dacă se urmărește schema sugerată de B. Maden (1968), atunci clivajul are loc la o particulă RNP 80S, cu formarea particulelor 55S și 30S de RNP.

Miller și Beatly (1969) sugerează că acest clivaj are loc la interfața dintre miez și cortex. Particula RNP 30S trece direct în citoplasmă, iar particula 55S din cortex este alterată pe o cale ce implică degradarea componentului său ribonucleic în componente 28S care, la adăugarea de proteină, formează particule 50S. La nucleolii cu cortexuri voluminoase, aceste particule se acumulează și rămîn în nucleol un timp oarecare, înainte de a fi transportate în citoplasmă. Schema aduce o oarecare explicație a zonării nucleolului în miez și cortex, dar nu explică alte trăsături citologice ale nucleolilor oocitelor de amfibieni; de exemplu, de ce la unele specii de amfibieni miezul este situat excentric, pe latura nucleolului cea mai apropiată de învelișul nuclear.

Scanned with OKEN Scanner

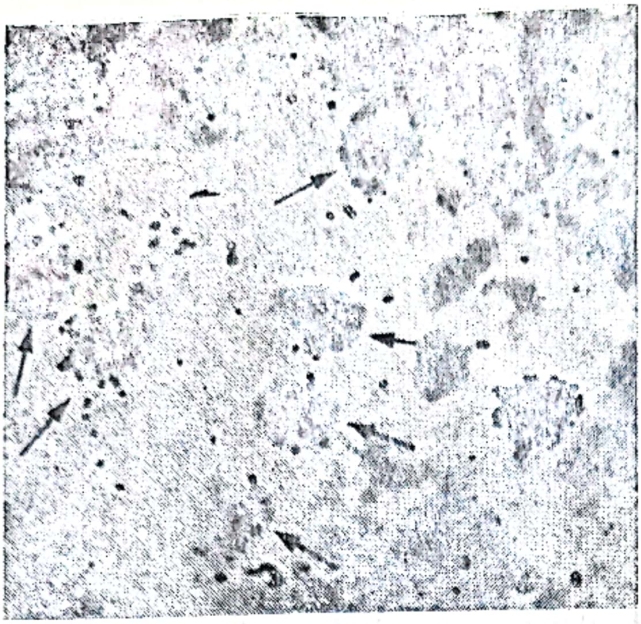


Fig. 151. Calote de *r*-ADN de la *Xenopus laevis*, care încorporează activ ^{3}H-timidină și care realizează amplificarea *r*-ARN datorită unei ADN-polimerază dependentă de ARN (după J. Brachet).

În ce privește citologia amplificării genice la amfibieni s-a constatat că în timpul stadiului pahiten în ovarele broaștelor tinere metamorfozate de *Xenopus laevis* o cantitate substanțială de material Feulgen pozitiv se formează în fiecare nucleu de oocită și crește rapid pentru a ocupa mai mult de jumătate din volumul nucleolului (fig. 151). Cromozomii în acest stadiu sînt așezați într-un buchet dezordonat. După stadiul pahiten nucleul intră într-un stadiu „difuz" în care se dezvoltă cromozomii „în perie" și crește volumul său. Nucleul se dilată concomitent cu alungirea cromozomilor, iar calota de cromatină se împrăștie și devine fin granulară, ca în final să se disperseze. Nucleul diplotenic, mare, este acum uniform granulat ca aspect și se colorează slab Feulgen. În acest stadiu s-a arătat prin microdensitometrie că nucleii conțin pînă la 42 µµg de ADN care este de circa 14 × cantitatea de ADN din setul haploid de cromozomi de *Xenopus laevis* (Mac Gregor, 1961). Mai tîrziu, în oogeneza de la *Xenopus*, sînt prezenți mii de nucleoli în fiecare veziculă germinală.

La *Bufo* ADN extracromozomal apare, ca și la *Xenopus*, tot în pahiten, dar sub formă de una sau mai multe grămezi răspîndite, nefiind așa de evident ca la *Xenopus*. În faza de diploten timpuriu grămezile se dispersează în granule extrem de mici Feulgen pozitive, alipite strîns de suprafața internă a membranei nucleare, turtite între ea și un nucleol mic, așa cum fenomenul a fost descris de King (1908), Peinter și Taylor (1942). Cînd nucleolii devin mai mari, granulele se evidențiază greu.

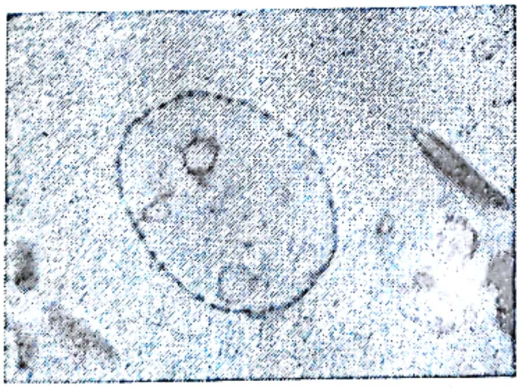


Fig. 152. Oocita de *Acipenser ruthenus* cu ADN extracromozomal pe fața internă a membranei nucleare (după I. Varo).

La *Triturus* și *Acipenser ruthenus*, cînd cromozomii diplotenici se condensează, granulele ADN „extracromozomale" sînt distribuite pe suprafața internă a membranei nucleare, nefiind asociate cu materialul nucleolar (fig. 152). Numai după ce cromozomii s-au reextins încep să se formeze nucleolii, cîte unul în asociație în fiecare granulă.

După 1960, hibridarea moleculară a arătat că genele pentru ARN ribozomal sînt localizate pe sau lîngă organizatorul nucleolar la *Drosophila melanogaster* și

Scanned with OKEN Scanner

Xenopus laevis. Trei grupe de cercetători și-au propus să studieze faptul dacă ADN „extracromozomal" al oocitei este într-adevăr nucleolar și include astfel genele pentru *r*-ARN. În acest caz oocitele vor fi foarte bogate în asemenea gene și această bogăție ar fi detectabilă și măsurabilă prin hibridarea moleculară cantitativă a ARN ribozomal marcat cu ADN-ul oocitei.

În primul experiment de acest fel, G a l l (1968) a folosit oocite pachitenice de *Xenopus laevis* și obține dovada clară a sintezei disproporționate a ADN în ovarele tinere, găsind o creștere de 20—30 ori a genelor ribozomale din ADN-ul ovarian în comparație cu ADN-ul somatic.

D. B r o w n și I. D a w i d (1968) au izolat și purificat ADN din vezicule germinale de la 3 specii : *Xenopus laevis, Siredon mexicanum* și *Necturus maculosus,* ADN care a fost separat prin centrifugare în două componente. O componentă mai mare cu densitate mică și care reprezintă majoritatea este ADN-ul cromozomal și o componentă redusă cantitativ, cu densitate mare, denumită și ADN „satelit", care a fost găsită în toate preparatele de vezicule germinale, dar a lipsit din preparatele cu ADN somatic. La cele 3 specii, cantitatea de ADN din vezicula germinală s-a găsit mai mare de 4C (*C* = cantitatea de ADN/set haploid de cromozomi), excesul de ADN găsindu-se în satelitul de densitate mare.

În al treilea experiment s-a încercat să se izoleze și să se măsoare ADN-ul din nucleolii oocitelor. D. E v a n s și M. B i r n s t i e l (1968) au găsit că *r*-ADN oocitar are o densitate mai mare decît *r*-ADN somatic, deducînd că fiecare oocită de *X. laevis* are circa 22 μμg de *r*-ADN. Ei apreciază că ADN-ul specific oocitei și cu densitate de 1,729 trebuie să fie localizat în nucleolul oocitei.

D. B r o w n și C. W e b e r (1968) calculează în nucleu existența a 450 unități 28S/18S care se repetă în fiecare acumulare redundantă în genomul de *Xenopus*. Studiile efectuate de M. B i r n s t i e l și col. (1968) au arătat că la *Xenopus* de tip sălbatic *r*-ADN satelit constituie circa 2% din totalul de ADN genomic și are o densitate de 1,7236 g/cm^3. El este o moleculă cu lanț dublu și 18—22% din el conține baze complementare cu *r*-ARN ; 60% din el nu hibridează cu *r*-ARN și reprezintă un ADN „spațial" cu conținut mai mare de G—C decît *r*-ADN complementar cu *r*-ARN.

Într-un studiu ulterior, I. D a w i d, D. B r o w n și R. R e e d e v (1970) au detaliat caracteristicile *r*-ADN de *Xenopus* și au făcut o comparație atentă între *r*-ADN cromozomal al celulelor somatice și *r*-ADN amplificat al oocitelor. Ei au reușit să separe *r*-ADN cormozomal și amplificat din totalul de ADN datorită conținutului său crescut în G—C. Singura diferență între aceste două *r*-ADN este conținutul lor în acid 5-metil-dioxicitidilic (5-MeC). *r*-ADN cromozomal conține 4,5% 5-MeC, iar *r*-ADN amplificat nu conține 5-MeC detectabil. Reziduurile de 5-MeC sînt localizate pe ambele lanțuri ale *r*-ADN cromozomal, incluzînd regiuni genice care sînt transcrise „in vivo". Autorii au prezentat un model al *r*-ADN care constă dintr-o unitate de aproximativ 9×10^6 daltoni, care se repetă de circa 450 ori în fiecare regiune a organizatorului nucleolar al genomului haploid. O secvență genică transcrie precursorul *r*-ARN 40S cu o secvență de lungime aproximativ egală, care nu transcrie ARN.

Scanned with OKEN Scanner

Prima dovadă concretă în raport cu mecanismul amplificării genice au constituit-o observaţiile lui Mac Gregor (1968) pe autoradiografiile încorporării timidinei —^{3}H în ADN din nucleii profazei meiotice la femelele tinere de *Xenopus*. În esenţă, nucleii pahitenici timpurii care au relativ puţin *r*-ADN amplificat se marchează mai puţin intens cu timidină —^{3}H decît nucleii ulteriori care au mai mult *r*-ADN amplificat. Din aceste observaţii Mac Gregor argumentează că replicările care duc la amplificare trebuie să urmeze o cale în care una sau mai multe copii extracromozomale sînt duplicate de organizatorul nucleolar şi detaşate, iar aceste copii detaşate suferă o serie de replicări pentru a rezulta numărul final de repliconi (fig. 153). Prin urmare, nivelul marcării unui nucleu ar fi proporţional cu cantitatea de *r*-ADN amplificat.

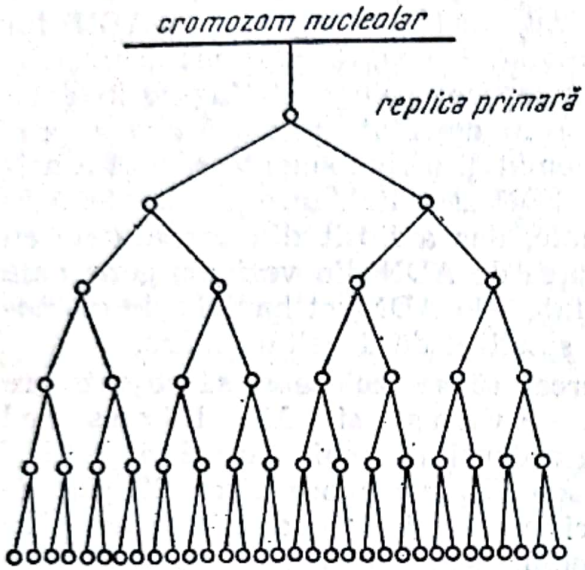


Fig. 153. Mecanismul „în cascadă" al amplificării genice (după Mac Gregor).

În 1971, G. Tochini-Valentini şi M. Crippa au experimentat şi demonstrat că amplificarea se produce printr-un mecanism de transcriere inversă în care *r*-ADN este copiat pe o matriţă de ARN de către o transcriptază inversă (v. fig. 151). Numeroase experienţe au urmărit să lămurească şi controlul amplificării genice. Măsurători citofotometrice ale conţinutului colorat Feulgen+ a 25 de nuclei pahitenici de la cinci femele de *Xenopus* au arătat clar că conţinutul în ADN al acestor nuclei a fost acelaşi în limita de 6% (Mac Gregor, 1968).

Brown şi Dawid (1968) au adus noi date cu privire la alte două specii de amfibieni : *Siredon mexicanum* şi *Necturus maculosus*. Aceste urodele, împreună cu *Xenopus laevis*, au fost alese pentru că valorile lor *C* acoperă întreaga variaţie găsită la amfibieni. *Xenopus* are valoarea *C* cea mai mică, de 3µµg ; *Necturus* are valoarea *C* cea mai mare, de 95 µµg, iar valoarea *C* a axolotului , de 35 µµg, este reprezentativă pentru grupul mare al urodelelor.

Brown şi Dawid, măsurînd cantitatea de *r*-ADN per genom, cantitatea de ADN nucleolar cu densitate mare şi cantitate de *r*-ADN per veziculă germinală la aceste specii, au arătat că oricare ar fi dimensiunile organizatorului nucleolar la un amfibian şi oricît de mulţi cistroni ribozomali conţine el, sistemul de amplificare în oocite este gradat corespunzător, astfel că sînt sintetizaţi numai un anumit număr de cistroni ribozomali adiţionaţi împreună cu „spacers". Studiile amplificării genice în oocitele de *Xenopus* normal şi în oocitele de *Xenopus*, care au fost heterozigote pentru mutaţia în care unul din cei doi organizatori nucleolari cromozomali suferă o deleţie, arată că deşi nucleii somatici ai ani-

Scanned with OKEN Scanner

malelor heterozigote au pierdut jumătate din complementul lor de *r*-ADN, conținutul de *r*-ADN din veziculele germinale a fost același la mutante ca și la indivizii normali. De aici se presupune că controlul amplificării ADN-ului nucleolar este sensibil numai la conținutul final al ADN-ului nucleolar în oocită.

Alte observații au dus la concluzia că amplificarea ADN-ului nucleolar este proporțională cu numărul organizatorilor nucleolari în exces față de cei obișnuiți. Această concluzie este, desigur, în contrast direct cu situația de la *Xenopus* mononucleolat unde există o deficiență a organizatorilor cromozomali, dar amplificarea ADN-ului nucleolar atinge totuși nivelul obișnuit al tipului sălbatic. La *Amblystoma jeffersonianum* triploidă există un exces de 3x al organizatorilor cromozomali și amplificarea ADN-ului nucleolar în aceste celule atinge 3x nivelul găsit în oocitele normale ale animalelor diploide. În această situație se poate crede că mecanismul compensator, care realizează în oocita de *Xenopus* o cantitate completă de *r*-ADN amplificat în eventualitatea unei deficiențe mutaționale a organizatorilor cromozomali, poate fi dintr-o categorie diferită ce permite superamplificarea ADN-ului nucleolar în populațiile unde femelele sînt poliploide și partenogenetice.

În concluzie, oocitele amfibienilor, începînd din oogonie și continuînd în stadiul pahiten, sintetizează 20—30 μμg de *r*-ADN care, în diploten, se dispersează sub forma unor granule așezate pe fața internă a membranei nucleare. În raport cu aceste granule se sintetizează și nucleolii. *r*-ADN conține secvențe pe care se transcriu subunitățile 18S și 28S ale *r*-ARN. La *Xenopus* numărul de gene amplificate constă din 450 tandemuri repetitive ale regiunii în dublu helix din ADN, care includ secvențele complementare de 28S și 18S ale *r*-ARN ce alternează cu un spațiu nefolosit ulterior. Densitatea ADN ribozomal, incluzîndu-se și cel dintre regiunile care transcriu, este în celulele somatice de *Xenopus laevis* de 1,7236 g/cm^{-3} și în oocite de 1,729. Amîndouă ADN-uri au 67% G + C, însă *r*-ADN somatic are 4,5% acid 5-metil-dezoxicitidilic care-i conferă o densitate mai mică. În oocite *r*-ADN este amplificat atît de organizatorul nucleolar cît și de un număr de cistroni adiționali. *r*-ADN realizat va forma un număr imens de nucleoli (peste 1000) care reprezintă tot atîtea aparate de sinteză a ribonucleoproteinelor ribozomale citoplasmatice.

În cursul vitelogenezei cromozomii capătă un aspect cu totul aparte la cefalopode, selacieni, teleosteeni, dipnoi, urodele, anure, reptile, păsări și monotreme, și anume, devin „plumoși" sau în „perie de lampă". Cromonema este de fapt o fibră de ADN în dublu helix, lungă de cîțiva zeci de centimetri (fig. 154). Ea se repliază în zig-zag formînd cromomerele ce apar înșirate ca niște mărgele pe ață. În dreptul fiecărei cromomere cele două catene de ADN-histone trimit cîte o buclă în sucul nuclear. H. Callan a demonstrat continuitatea cromozomului digerîndu-l în întregime, adică bucle și cromomere, cu DN-ază. Cromomerele sînt constituite din secvențe mediu repetitive și ele variază ca număr la speciile înrudite. În schimb, cantitatea și expresia genelor unice sînt asemănătoare la speciile înrudite. Dacă secvențele mediu repetitive joacă un rol în reglajul specific al transcripției, amplificarea și diversificarea lor

Scanned with OKEN Scanner

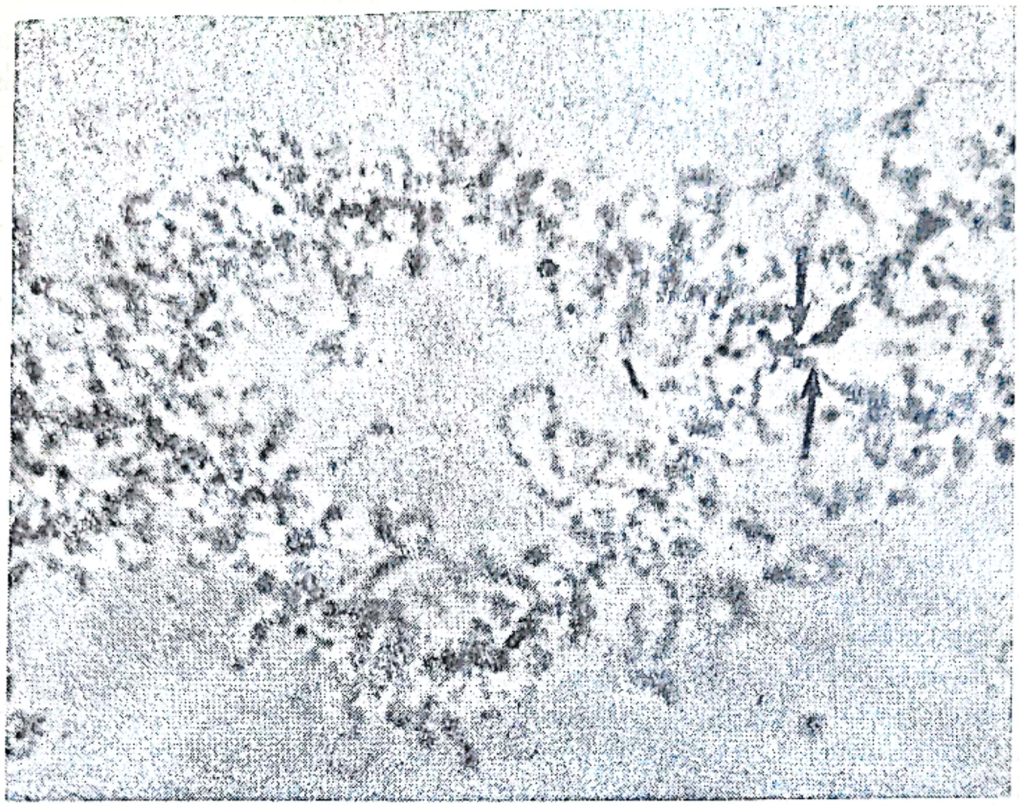


Fig. 154. Cromozomi „plumoşi" sau „în perie de lampă" de la *Plethodon cinereus.* Săgeţile indică centromerul (după M. V l a d).

nu au nici o importanţă asupra citodiferenţierii. La *Xenopus,* ca şi la om, 40% din genom este constituit din secvenţe repetitive. Localizarea unor secvenţe foarte repetitive în centromer indică un rol în menţinerea structurii cromozomului, dat fiind cazul nucleilor „cu cromocentre" la care, chiar şi în interfază, porţiunile de cromozomi de lîngă centromere rămîn condensate.

F. C r i c k sugerează un alt rol al ADN repetitiv din cromocentre şi anume în reglarea activităţilor genelor de structură localizate în buclele laterale. R. K r a m (1972) şi E. D a v i d s o n (1971) descoperă la *Drosophila,* cît şi la *Xenopus,* că genomul prezintă o alternanţă de secvenţe repetitive şi de secvenţe unice : 50% din genom este format din alternanţe de secvenţe repetitive, de 300 nucleotide fiecare şi din secvenţe unice, de 800 nucleotide ; restul este format din secvenţe unice. Prin metode autoradiografice se vede că buclele cromozomilor plumoşi încorporează ^{3}H-uridină, iar sinteza ARN, la care participă uridina marcată, se propagă de la o extremitate a buclei şi continuă de-a lungul ei terminîndu-se la cealaltă extremitate. Deci sinteza este unidirecţională. Pe o asemenea buclă de ADN cu gene „producătoare" sau „de structură" iau naştere, perpendicular pe ea, o serie de fibre mari de ARN care au fost văzute la microscopul electronic de către O. M i l l e r. Genomul unor astfel de oocite are 20 $\times$ 10^{6} perechi de secvenţe unice pentru transcrierea *m*-ARN, adică o informaţie globală de 4—5 ori mai mare ca a unei celule protocariote. Pe măsură ce transcrierea şi biosinteza proteică descresc, are loc şi regresia cromozomilor plumoşi, care se condensează.

Scanned with OKEN Scanner

În timpul acestor activităţi de sinteză, numărul nucleolilor creşte cu multiplii de 250, ajungînd la 1500 şi, odată cu aceasta, ARN-polimeraza I devine de 1000 ori mai activă ca în celulele somatice. Deci, amplificarea organizatorilor nucleolari este de 1500 ori, iar genele ribozomale sînt cu un milion mai multe. Pe un segment de *r*-ADN se transcrie *r*-ARN 18S şi cel 28S, iar pe segmentul următor „spacer" se transcrie încă o porţiune de *r*-ARN, care însă se va elimina.

Sucul nuclear care umple nucleul conţine o masă de proteine de proveniență citoplasmatică, o fosfoprotein-fosfatază, esteraze, dipeptidaze şi o ribonuclează. Prin aceasta din urmă se elimină o parte din moleculele de ARN sintetizate, maturîndu-le înainte ca să fie expulzate în citoplasmă. ARN-polimeraza II din sucul nuclear serveşte transcrierii pe buclele cromozomilor a *m*-ARN şi are o activitate foarte crescută, chiar şi în perioadele tîrzii ale ontogeniei. Tot în citoplasmă există un excedent de ADN care fixează actinomicina marcată cu tritiu, şi apare astfel pe autohistoradiografii. Carioplasma mai conţine şi un *D*-ARN [1] şi unul bogat în uracil. J. Brachet crede că *D*-ARN corespunde unor mesaje, de mărimi variabile, iar ARN-ul bogat în uracil părţilor lipsă din mesaje în urma „maturării" lor în nucleu.

Şi spermatozoidul prezintă o evoluţie moleculară la fel de intensă, dar care duce la rezultate oarecum deosebite. Aşa, de pildă, în spermatogonie se dublează cantitatea de ADN, atingînd 4 C[2], fără ca ea să se dividă. După o serie de diviziuni se transformă în spermatocită de ordinul I, care conţine tot 4C ADN. În urma diviziunii heterotipice dintr-o spermatocită de ordinul I rezultă două spermatocite de ordinul II cu 2C, iar după diviziunea homeotipică dintr-o spermatocită de ordinul II rezultă două spermatide cu 1C. Perioada *S* a acestor diviziuni — meiotice — durează o săptămînă la amfibieni. H. Callan a marcat „in vivo" nuclei somatici şi seminali cu timidină tritiată, iar după cîtva timp a extras ADN şi a obţinut cu el autohistoradiografii. În felul acesta a constatat că punctele de iniţiere ale sintezei ADN (repliconii) sînt aşezaţi la distanţe regulate. Sinteza este bidirecţională la celulele somatice, adică de la un replicon ea se propagă de o parte şi de alta a acestuia, în două direcţii opuse.

La celulele seminale, în meioză, sinteza ADN este unidirecţională, cu o viteză de 9 µm/oră la *Xenopus* şi 20 µm/oră la *Triturus*. Distanţa dintre repliconi este între 20—125 µm şi, în meioză, numărul repliconilor este mult mai mic ca în mitozele somatice, explicîndu-se de ce durata acestei diviziuni este aşa de mare.

În stadiile premergătoare meiozei (pahiten) are loc o sinteză a enzimelor de reparaţie (endonucleaze, ADN-polimeraze, ligază) şi a unei proteine cromozomale care vor intra în funcţiune în timpul diviziunii heterotipice, pentru a remedia rupturile produse de „crossing-over"-uri. În timpul meiozei cromozomii împerecheaţi se unesc la nivelul chiasmelor în „complexe sinaptonemale", vizibile la microscopul electronic. Axul acestor complexe este o fibră unică de ADN pe care stau particule proteice şi ARN. Aceste complexe fixează cromozomii perechi, strîns apro-

[1] *D*-ARN = ARN complementar ADN-ului.
[2] *C* reprezintă complementul cromozomal care corespunde unui ADN al genomului haploid.

Scanned with OKEN Scanner

piaţi unul de celălalt. În perioada spermiogenezei are loc o eliminare progresivă a ARN nuclear şi citoplasmatic, astfel că spermatozoidul nemaiconţinînd ARN nu sintetizează nici proteine. În nucleu locul histonelor bogate în lizină este luat de protamine care se fosforilează la serină şi treonină printr-o proteokinază activă în prezenţa c-AMP, apoi protaminele acestea, bogate în prolină, se defosforilează şi cromatina (adică cromozomii) devine stabilă şi condensată în filamente paralele.

Aparatul lui Golgi formează o vacuolă mare numită *acrozom* cu o granulă acrozomică în ea. Acest acrozom are valoarea unui lizozom deoarece conţine o serie de enzime cu care digeră membranele oului. Centrozomii se dispun la o oarecare distanţă unul de altul : cel proximal la baza nucleului şi cel distal depărtat de el dînd naştere flagelului. Mitocondriile se dispun în jurul celor 9 perechi de tubuli dintre cei doi centrioli. Ele produc energia necesară mişcărilor cozii spermatozoizilor, iar la spermatozoizii fără coadă M. Varo a arătat că respiraţia este suplinită de activitatea fosforilării oxidative a corpilor mielinici din astfel de celule.

Spermatozoidul se transformă într-o celulă mobilă datorită flagelului. Spermatozoidul uman, de 55—66 μ, are un *cap* (nucleu) de 5 μ, un *gît*, *piesa intermediară* cu mitocondriile de 10 μ şi o *coadă* de 40 μ. Prin bătăile flagelului înaintează circa 2 mm/minut şi trăieşte în medie la om cam 3 zile pe căile genitale. Sînt produşi aproximativ 100 milioane pe cm^3 de spermă, în timp ce femeia are la naştere abia 200 000—300 000 de ovule, dintre care aproximativ 250—350 de oocite se vor matura după pubertate.

12.2. SEMNIFICAŢIA „PUFFING"-ULUI DIN CROMOZOMII GIGANŢI AI DIPTERELOR

Este aceea a localizării şi activităţii genice vizibile la microscop. E. Balbiani (1881) a descoperit cromozomii politenici din glandele salivare de *Chironomus* sub forma unor cordoane striate transversal, legate de un nucleol şi purtînd pe ei nişte inele mai groase cunoscute de atunci sub numele de „inelele Balbiani" sau „puffing"-uri, după autorii englezi care i-au studiat mai tîrziu.

Aşa cum au arătat E. Heitz şi H. Bauer (1933), aceste cordoane sînt în realitate cromozomi deveniţi uriaşi în dimensiuni, mai mari de 500 μ lungime şi 200 μ Ø. H. Bauer a arătat că gigantismul lor se datoreşte replicării multiple şi dirijate a cromatidei care are loc fără contracţia mitotică şi separarea în cromatidele lor fiice ca de obicei. Cromozomii giganţi sînt deci constituiţi din cromatide multiple, alungite, ajungîndu-se pînă la 2^{14} şi acest stadiu se numeşte *politenie*. Cromozomii giganţi conţin deci un număr 2^n cromatide, iar valorile de ADN, cu toate că prezintă o creştere geometrică, arată în unele cazuri o diminuare în raport cu valoare haploidă calculată, ceea ce înseamnă că nu toate regiunile cromatidei participă la procesul de politenizare.

Organizarea cromatidei în cromozomii politenici giganţi se prezintă ca o alternanţă specifică de *benzi* transversale bogate în ADN şi de *interbenzi* sărace în ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Revelația că aceste structuri prezintă pur și simplu o amplificare a localizării liniare a factorilor ereditari pe cromozomi a entuziasmat încă din 1934 pe T. Painter care spunea, vorbind de aceste descoperiri : „a fost clar că noi am avut în puterea noastră materialul despre care fiecare și-a făcut vise. A fost clar... că s-a găsit calea principală care să ne ducă spre locul genei."

Într-adevăr, prin exemplul pe care-l vom da, se poate înțelege bine de ce benzile transversale reprezintă locuri de activitate genică.

Lucrările lui H. Slizynska și E. Gersh au stabilit că genele „*with*", „*roughest*" și „*notch*" sînt situate, în ordinea enunțării, într-o anumită regiune a cromozomului X care corespunde cu secțiunea 3C din harta cromozomilor salivari de la *Drosophila melanogaster* a lui Bridges. Această regiune conține 12 benzi, dintre care primele 7 perechi vor fi analizate în cele ce urmează. Cînd un cromozom are mutante „*whith*" înseamnă că poartă o rearanjare în această regiune, deoarece apar în descendență mutante ce nu sînt complementare. Tocmai în aceste cazuri banda $3C_1$ sau banda dublă $3C_2$, sau amîndouă, lipsesc ori sînt transferate în heterocromatină. Din mutanta „*whith*" s-a reușit izolarea unui mutant letal care prezenta banda $3C_3$ și, prin studiul altor rearanjări, s-a putut dovedi că $3C_1$ reprezintă locusul unui mutant letal și nu are legătură cu mutante „*whith*", astfel că mutanta respectivă se găsește pe locusul $3C_2$ cu gene letale de fiecare parte (fig. 155). În ceea ce privește $3C_4$, care este o bandă foarte subțire și conține locusul

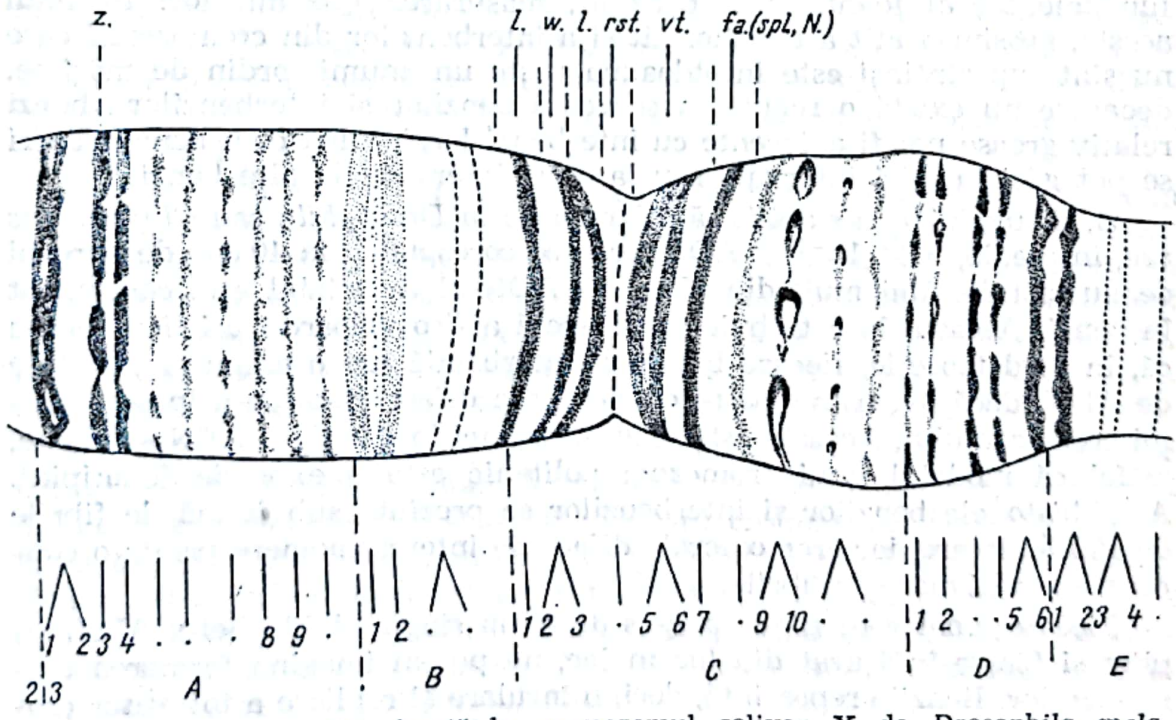


Fig. 155. Regiune „*white-facet*" la cromozomul salivar X de *Drosophila melanogaster* :

z. — „zeste" ; *l.* — letal ; *w.* — „white" ; *rst.* — roughest ; *vt.* — vertical ; *fa.* — „facet" ; *spl.* — „split" ; *N* — „notch" (după H. Slizynska și E. Gersh).

mutantei „*roughest*", s-a precizat că pierderea sa produce ea singură efectul „*roughest*", care este letal la mascul. Din contră, pierderea benzii următoare $3C_{5/6}$ nu afectează puternic structura ochiului și vitalitatea muștei, în schimb produce dispariția unor peri verticali. Este locusul unei gene care determină apariția cheților. În sfîrșit, banda $3C_7$, groasă, conține un grup de factori cu efect complementar parțial, letal sau neletal, care realizează genotipuri asemănătoare, și anume : „*facet*", „*split*" și „*notch*". Deci porțiunea de gene „*whith*" — „*notch*" cuprinde benzi sau cromomere care poartă cîte o genă mendeliană unică. Considerăm și banda $3C_7$ ca factor mendelian al unei singure gene. În cromozomul X de la *Drosophila* sînt 1021 benzi ; experimental, s-a putut demonstra prezența a 1000 de gene, după probele de complementare între mutanții letali obținuți prin iradiere.

Studiile de microscopie electronică la cromatide efectuate de H. Berendes (1970) au arătat ca nefondate obiecțiile privind spațiile exacte dintre benzi și interbenzi. Bineînțeles că aceste cercetări foarte dificile presupun o întindere perfectă a cromozomului pentru a se separa benzile care sînt strîns lipite între ele. Microscopia electronică confirmă afirmația că benzile sînt unități caracteristice, indiferent de grosimea lor; aceasta, cu toate că unele benzi apar întotdeauna ca linii continue de aceeași grosime în toate planurile optice sau de secționare, iar altele formează un șir de puncte sau liniuțe echidistante. Studiile de microscopie interferențială au arătat că distribuția masei sau a densității masei în diferitele benzi arată valorile maxime în cele groase, considerate a fi heteropicnotice. Marea majoritate a cercetătorilor au arătat ca drept criteriu fundamental al identificării benzilor, măsurarea grosimii lor. În felul acesta, grosimea atît a benzilor cît și a interbenzilor din cromozomii care nu sînt supraîntinși este întotdeauna peste un anumit ordin de mărime, deoarece nu există o regulă în secvența benzilor și interbenzilor : benzi relativ groase pot fi adiacente cu interbenzi largi, după cum benzi subțiri se pot găsi la mici intervale sau la mari intervale de alte benzi.

G. Rudkin a stabilit că o bandă de la *Drosophila* sau *Chironomus* are, în medie, 5×10^{-17} g ADN, ceea ce corespunde la 40 000 de perechi de nucleotide. Mai mult din 95% din ADN-ul detectabil este concentrat în benzi. Aceasta însă trebuie considerată a fi o valoare statistică pentru că, în mod teoretic, fiecare bandă și interbandă are o anumită cantitate de ADN, dacă avem în vedere condensarea diferențiată de-a lungul axului cromozomului. Aceasta este rezultatul unei interacțiuni ADN—histone, astfel că modelul unui cromozom politenic este o expresie fenotipică. ADN-histonele benzilor și interbenzilor se prezintă sub formă de fibrile de 100 Å fiecare, iar cromomerele diferă de intercromomere printr-o concentrație mai mare de fibrile.

Fiecare cromozom fiind compus dintr-un singur dublu helix ADN repliat și foarte înfășurat din loc în loc, ne putem imagina formarea cromomerelor. Benzile reprezintă, deci, o înrulare și repliere a tot atîtor cromatide și, dacă avem în vedere că numărul lor este la unele chironomide de 32 000, înseamnă că fiecare bandă reprezintă 32 000 de cromomere. Lungimea fiecărei cromomere întinse este de 30 μ, cu 100 000 de perechi de baze de ADN. Chiar și în complexul ADN-histone există o supraînru-

Scanned with OKEN Scanner

lare, dar replierea într-o structură atît de compactă amintește replierea acizilor nucleici din corpul fagilor. Totuși, datorită preciziei cu care benzile și interbenzile sînt delimitate, nu putem să nu admitem că modelele benzilor reprezintă un atribut al însuși materialului genetic. Faptul că într-o anumită regiune cromozomală apare o anumită bandare în unele celule a unui țesut dat, într-un anumit stadiu al dezvoltării individului, arată că la nivelul ADN trebuie să existe pentru fiecare cromatidă o diferențiere liniară sau subdiviziuni ale sale care, într-un anumit stadiu de dezvoltare, să se exprime în mod concret.

Studierea migăloasă a benzilor de la diferitele țesuturi de *Chironomus* relevă variații subtile specifice lor (benzilor). Ele constau în anumite benzi sau mici grupuri de benzi. Amplitudinea acestei variații este mică și, în multe cazuri, duce la diferențierea „puffing"-urilor. Un lucru rămîne însă bine stabilit, că fiecare bandă are caracteristicile sale, care constau într-un număr anumit de cromatide de o grosime dată și care pot căpăta aspecte diferite în raport cu țesutul în care se găsesc nucleii, deci cu funcționarea genică dintr-un anumit timp al vieții țesutului considerat. Totuși, o bandă sau interbandă dată care apare specific diferit în diferitele țesuturi reprezintă o anumită subunitate individuală sau o subsecție a genomului. Este stabilit faptul că acești cromozomi politenici rezultă din cromozomi care se replică, dar nu se separă în cursul dezvoltării dipterelor superioare. Astfel, timidina -^{3}H administrată într-o perioadă scurtă de timp în cursul replicării acestor cromozomi poate fi localizată în două moduri : într-unul se marchează întreg cromozomul, benzile mai puternic și interbenzile mai slab, în al doilea caz încorporarea timidinei -^{3}H corespunde cromomerelor mai groase. Aceste deosebiri se datoresc faptului că ciclul de replicare a cromozomilor începe simultan în cromomere și intercromomere, sau se termină la timpi diferiți după cantitatea de ADN, cromomerele cele mai groase terminînd ciclul cel mai tîrziu.

Regiunile kinetocorului sînt cele care termină ultimele replicarea în cadrul unui ciclu. Deci, cromomerele sînt considerate ca unități de replicare sau *repliconi,* cu alte cuvinte se admit cromomerele-repliconi ai eucariotelor superioare ca fiind analoage cromozomilor virali bacterieni care se comportă ca repliconi unici. Cum numărul de cromomere per genom este specific și nu variază, mărimea medie a unui replicon de la organismele superioare este de 10^4—10^7 perechi de nucleotide.

H. Keyl (1965) a descoperit că duplicarea genică în cazul acestor cromozomi nu se face numai prin duplicarea cromomerelor, ci și prin dublarea cantității de ADN a unei singure cromomere. Măsurînd cantitatea de ADN din cromomerele omoloage la indivizi de *Chironomus thummi-thummi* ori *Chironomus thummi-piger*, a găsit o tendință generală la *Chironomus thummi-thummi* a multiplicării de 2-4-8-16 ori a cantității de ADN din cromomere față de cromomerele omoloage de la *C. thummi-piger.* Specificăm că fiecare din cromomerele omoloage au o anumită cantitate de ADN la început. Există, deci, o duplicare în progresie geometrică a ADN. Cum repliconii au puncte de inițiere distincte ale replicării și de terminare a sintezei pentru fiecare ciclu de replicare a ADN, se produce un replicon de lungime dublă cu ocazia acestei replicări

Scanned with OKEN Scanner

suplimentare bine delimitate. Dar ca să se realizeze duplicarea, contactul dintre punctul de inițiere și de încheiere a replicării trebuie să fie alăturat, repliconul avînd o configurație inelară.

Creșterea cromozomilor în cursul evoluției prin duplicarea cantității de ADN din cromomere este un fenomen care deschide noi orizonturi în studiul evoluției. De exemplu, garnitura cromozomică de *C. thummi-thummi* conține 27% mai mult ADN decît aceea de la *C. thummi-piger*, ceea ce înseamnă că se poate produce o mărire a taliei cromozomilor și cantității de ADN, fără să aibă loc o multiplicare a cromatidelor, evoluția cromozomilor mergînd pe această cale în sensul măririi cromatidelor. Este cunoscut cazul cînd cromozomi cu cantități diferite de ADN din aceeași garnitură cromozomică au cromomere cu grade diferite de duplicare a ADN.

Studiile lui F. Mechelke (1933, 1962), M. Breuer, K. Pavan (1955), W. Beermann (1962), H. Beckeer (1959), R. Panitz (1962) au demonstrat diferențierea cromozomilor din glandele salivare a unor diptere. Aceste glande sînt alcătuite din 3 lobi : principal, lateral și anterior. Ei sînt formați din celule mari însă cu funcții diferite; lobii principali și laterali produc o secreție care conține hidroxiprolină, în timp ce lobul anterior nu are hidroxiprolină, în schimb, la începutul dezvoltării, se încarcă cu un pigment carotenoid. Aceste diferențe funcționale dintre cei 3 lobi implică diferențe specifice în puffing-urile cromozomilor lor.

Există 3 perechi de cromozomi giganți per nucleu la *Acricotopus lucidus*, fiecare din ei avînd un tip de bandare propriu și, în plus, markeri citogenici suplimentari, cum sînt o inversie homozigotă sau heterozigotă în cromozomul I și organizatorul nucleolar în cromozomul III (fig. 156). Înainte de metamorfoză se observă 2 inele ale lui Balbiani sau puffing-uri mari în celulele lobului principal, și anume unul în brațul scurt al cromozomului I(BR1) și celălalt în brațul scurt al cromozomului II (BR2). Aceleași puffing-uri le întîlnim și în cromozomii I și II ai lobului lateral unde, în plus, apare în cromozomul II, aproape de BR2, încă un inel al lui Balbiani-BR6. Aceste 3 locus-uri de inele nu apar sub formă de puffing-uri în cromozomii lobului anterior ci numai sub forma unor benzi transversale tipice. În schimb, aceștia prezintă inele mari ale lui Balbiani pe brațul lung al cromozomului I (BR3), pe brațul lung al cromozomului II (BR4) și lîngă organizatorul nucleolar de pe cromozomul III. În stadiul de prepupă, odată cu declanșarea metamorfozei, apar diferențe mari în aspectul acestor formațiuni : în lobul anterior, odată cu apariția pigmentului carotenoid, regresează toate cele trei puffing-uri de pe cei 3 cromozomi. Este limpede că fenomenul de „puffing" corespunde regiunii cromozomice.

Observațiile făcute asupra apariției puffing-ului au arătat că originea sa se găsește întotdeauna într-o anumită bandă, care începe să se umfle, devine difuză și pierde din colorabilitate. Sînt cazuri cînd colorabilitatea nu scade atît de mult deoarece unele puffing-uri, crescînd, au lîngă ele alte benzi adiacente care, la o observație superficială, sînt asamblate într-un singur puffing cu toate că în realitate sînt independente. Dar sînt și cazuri în care mai multe banzi (5) pot să concure într-o acti-

Scanned with OKEN Scanner

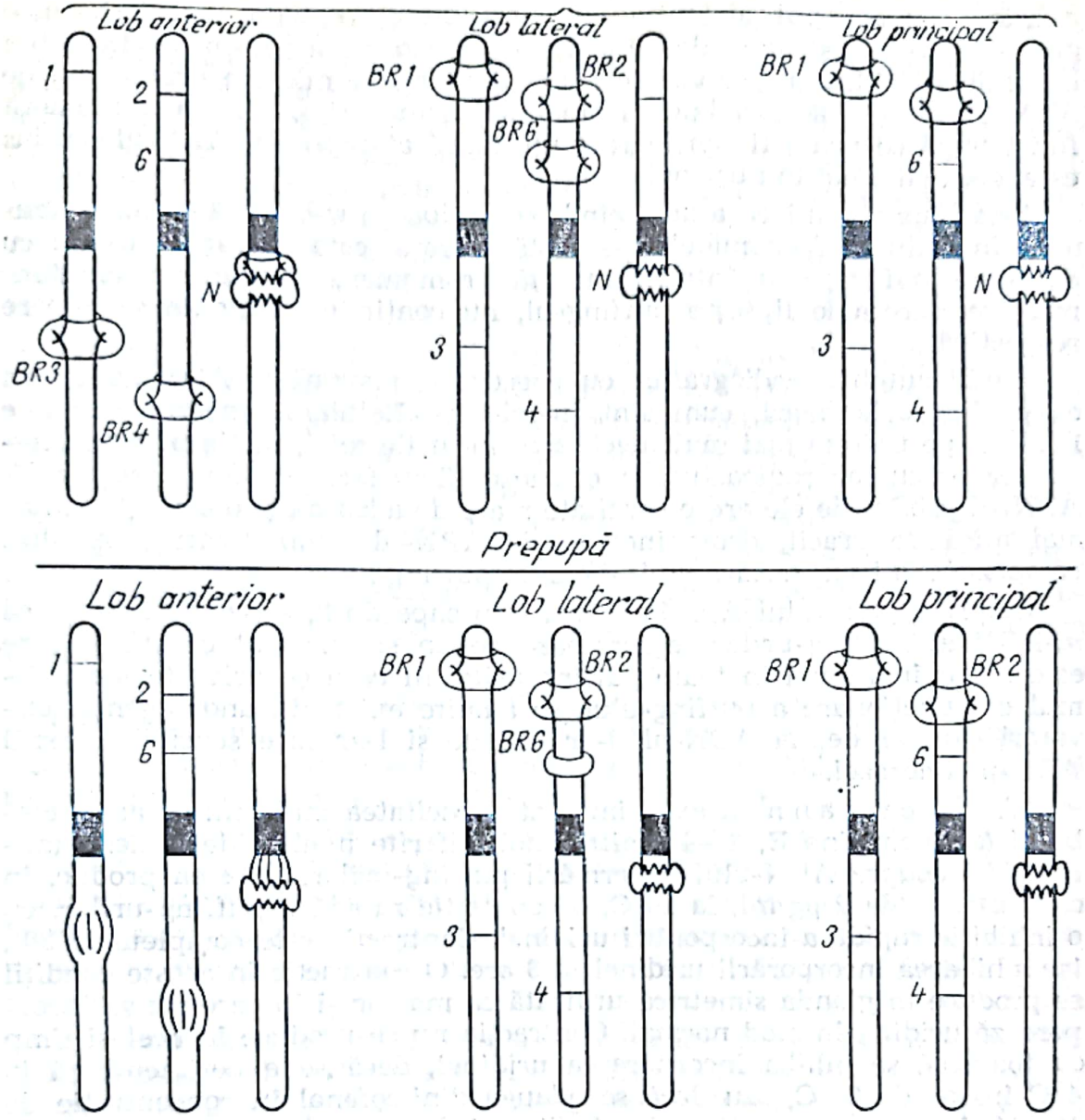


Fig. 156. Diagrama reprezentării diferenţierii cromozomice din glanda salivară de la *Acricotopus lucidus* şi schimbările care se produc în cei 3 cromozomi în timpul metamorfozei :

Br_{1-6} — inele ale lui Balbiani ; *N* — nucleol (Explicaţia în text) (după F. Mechelke).

vitate simultană prin asamblarea unui puffing complex. De asemenea, un inel de-al lui Balbiani poate fi fragmentat în două, fiecare jumătate putînd forma un nou puffing în poziţia pe care o are.

În cazul dipterelor studiate s-a constatat că perioadele de activitate intensă ale puffing-urilor sînt în timpul formării şi, mai tîrziu, în timpul năpîrlirii prepupale ; de asemenea, unele puffing-uri pot fi active în amîndouă stadiile, în timp ce altele numai în unul din ele. Perioada maximă de activitate are loc imediat înainte de formarea pupei şi la 8 ore după formarea prepupei. Analiza electronmicroscopică a puffing-urilor

Scanned with OKEN Scanner

a arătat că ele sînt alcătuite din fibre lungi repliate, formînd bucle groase de 100 Å și lungi de 10 μ. De fiecare parte a acestui ax în dublu helix de ADN-histone se găsesc particule fibroase mici de proteine și de ARN. Totalitatea acestor bucle formează puffing-urile, adică o cromomeră funcțională ce poate fi considerată un adevărat replicon. ARN-ul produs este, deci, eliminat în nucleoplasmă.

Este bine stabilit că atunci cînd se produce o substanță chimică anumită în saliva chironomidelor, această secreție este în raport direct cu existența puffing-ului într-o anumită cromomeră. Mutantele spontane recesive, cărora le lipsește puffing-ul, nu conțin componenta secretoare respectivă.

Studii autohistoradiografice cu precursori marcați ai ADN au arătat că puffing-urile mari, cum sînt inelele lui Balbiani, încorporează de 1000 ori pe unitate mai mult decît puffing-urile mici, în timp ce cantitatea de precursor radioactiv al cromozomilor fără puffing este nulă. ARN-ul produs de ele are o cantitate mare de adenină și o cantitate mult mai mică de uracil, deosebindu-se de ARN-ul citoplasmatic; în plus, compoziția în baze variază mult de la un puffing la altul.

Datorită raportului A/U între baze aproape de 2, s-a emis ipoteza că *m*-ARN al puffing-urilor se formează pe un singur lanț de ADN, care este bogat în timină în toate puffing-urile. În ceea ce privește mecanismul de funcționare a puffing-ului, se admite existența unor agenți activatori care ar deplia ADN-ul, l-ar întinde și l-ar face sensibil acțiunii ARN-polimerazei.

W. Beermann a experimentat capacitatea mai multor antimetaboliți (actinomicina B, 2—4 dinitrofenol, diferite nucleozide și dezoxinucleozide) asupra ADN-ului și formării puffing-urilor. Acestea produc, în concentrație de 2 μg/ml, la 20°C, o contracție rapidă a puffing-urilor, cu o inhibiție rapidă a încorporării uridinei. Contracția este completă în 30′, iar inhibarea încorporării uridinei în 3 ore. O contracție în aceste condiții se produce în glanda simetrică utilizată ca martor și în care nu se încorporează uridina în mod normal. Contracția nu se produce în același timp cu toate că se inhibă încorporarea uridinei, dacă se experimentează la 4°C în loc de 20°C, sau dacă se adaugă dinitrofenol în concentrație de 10^{-4}M, împreună cu actinomicină. Și mai departe, dacă glandele tratate cu actinomicină la temperaturi joase sînt apoi spălate într-un mediu nutritiv și transferate la temperatura ambiantă, contracția se produce.

Aceste experiențe arată că actionomicina se leagă de cromozom și inhibă sinteza ARN, dar ea nu produce contracția puffing-urilor decît la o anumită temperatură. Contracția necesită, pe lîngă temperatură, și un aport de ATP. Însă, la o concentrație mare, de 20 μg/ml, se blochează brusc sinteza ARN, cromozomii se condensează, dar puffing-urile rămîn întregi. Slaba concentrare a actionomicinei care se leagă de ADN activează în puffing-uri o reacție enzimatică ce determină replierea ADN într-o cromomeră compactă, ceea ce produce oprirea sintezei ARN; or, tocmai această repliere este cauza inhibării sintezei ARN.

Adăugînd la mediul de incubat adenozină sau guanozină în concentrație de 10^{-4} se produce în glandele salivare o contracție rapidă a puffing-urilor și o reducție a încorporării uridinei timp de 30 minute, în timp ce adau-

Scanned with OKEN Scanner

sul uridinei nu produce nici reducția puffing-urilor, nici a sintezei ARN în 60 minute. Pe de altă parte, s-a putut demonstra acțiunea inhibitoare a adenozinei asupra sintezei ARN în culturi celulare de șoarece. Dacă asemenea celule sînt infectate în prealabil cu viruși cu ARN, de asemenea se inhibă sinteza ARN-ului viral. Aceasta sugerează că punctul de atac al adenozinei se plasează înaintea etapei de polimerizare a nucleotidelor, probabil la nivelul fosforilării uridinei. De aceea, mai corect este să spunem că puffing-ul este o consecință a sintezei ARN, deoarece contracția puffing-urilor se poate produce sub acțiunea unor substanțe care să elimine precursorii ARN.

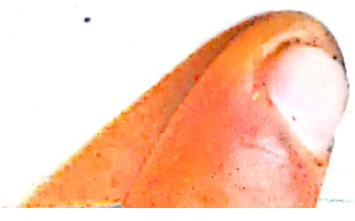
E. Beermann presupune că puffing-ul apare la echilibrul dintre sinteza *m*-ARN și eliminarea sa din cromomeră. Dacă aceste două activități sînt scăzute, așa cum apar la temperaturi joase sau în prezența dinitrofenolului, nu se constată nici o schimbare în puffing ; dacă însă este scăzută numai sinteza, puffing-urile se contractă. Actinomicina la temperatură scăzută este mai puțin eficace asupra contracției, pentru că sinteza și eliberarea produsului au loc într-o mică proporție. Aspectele apariției simultane de noi puffing-uri în noi locusuri sau dispariția lor la alți cromozomi, apare în această concepție ca o schimbare reală în activitatea de transcripție.

Apariția și regresia puffing-urilor se desfășoară simultan cu reglajul sintezei *m*-ARN. Hormonul ecdisonă se știe că induce puffing-uri din 2 cromomere specifice de *Chironomus tentans*. Mărirea puffing-ului reflectă nu atît mărirea sintezei *m*-ARN, cît modificarea procentului său de eliminare. Eliminarea se face întotdeauna după ce *m*-ARN a fost „împachetat" în proteine bazice, chiar în puffing-uri, numai sub formă de ribonucleoproteină ; este posibil transferul mesagerului din cromozom în citoplasmă. Apare în felul acesta o nouă funcție a ADN-ului cromomerei de a procura și substratul necesar împachetării și stabilizării mesajelor produse.

În concluzie, puffing-ul este o desfășurare coordonată de fibre de ADN-histone ale benzilor transversale individuale și, cum există o singură buclă de cromatidă, puffing-ul are atîtea bucle cîte cromatide conține cromozomul politenic. Acest fenomen este reglat permanent de inductori și represori ai ADN, iar o serie de factori reglează eliminarea ARN-proteine din puffing-uri în carioplasmă și apoi în citoplasmă. Studiul lor ne prezintă expresia vizuală la microscopul fotonic a activității genice sub forma ei de *transcripție*, în primul rînd, dar și a unei funcții în plus a ADN, și anume aceea de *reglare a transferului informației* în timpul diferențierii celulare la eucariote, în al doilea rînd.

12.3. PUFFING-URILE CROMOZOMILOR Y DIN SPERMATOGENEZA DROSOFILEI

Au fost descoperite de O. Hess, G. Mayer și W. Beermann (1961—1963). Examinînd spermatocite de la 50 specii de drosofile în contrast de fază, apar o serie de structuri bogate în ARN, iar în unele locuri



și în ADN, care lipsesc la masculii *XO* (fără Y) nefertili. Cel mai bine se vede conținutul intranuclear la *Drosophila hydei*. Nucleul este ușor piriform, iar nucleolul stă lipit de membrana nucleară în regiunea alungită a nucleului.

În carioplasmă, M e y e r deosebește cinci aspecte diferite bine individualizate „in vivo" : *filamente, măciuci, pseudonucleoli, panglici tubulare* și *noduri* ; toate sînt perechi, în afară de panglica tubulară.

Pseudonucleolii sînt contopiți fiind constituiți dintr-o pereche de filamente axiale foarte înghemuite, înglobate într-o matrice fibrogranulară. De pseudonucleoli sînt legate o pereche de „conuri" refringente. De la nucleu pornesc o pereche de filamente proximale compacte, care se continuă prin filamente distale difuze, legîndu-se de pseudonucleoli. Apoi panglica tubulară poartă la extremitățile sale măciucile. Filamentele sînt de 40 μ lungime, apărînd ca două componente, și anume, una axială, compactă, groasă de 0,5 μ, învelită de alta difuză, formată din elemente tubulare.

Matricea axială compactă, groasă de 1,5 μ, este sub formă de fibre compacte înconjurate de un material difuz. Filamentele difuze se încolăcesc mult într-un loc, unde, în jurul fibrelor sale, se adună granule osmiofile mari, înconjurate de alte granule mici. Ansamblul acesta fibrogranular constituie cele două „măciuci". Panglicile tubulare constau din două elemente mai mult sau mai puțin înrudite, compuse la rîndul lor din microtubuli. La masculii fără brațul lung al cromozomului Y apar „nodurile", care sînt una sau două perechi de bucle lungi de 40 μ, cu extremitățile spre nucleol. Toate aceste formațiuni (pseudonucleoli, măciuci, filamente, noduri panglici tubulare) sînt părți transformate din cromozmul Y, așa cum o dovedește faptul că toate spermatocitele cu *YY* au aceste structuri în dublu exemplar. Cum cromozomul *Y* este heterocromatic și nu conține informații genetice necesare dezvoltării somatice, este probabil că aceste structuri sînt necesare în spermiogeneză, mai precis în desăvîrșirea unor spermatozoizi fertili.

Problema a fost rezolvată prin studii de citogenetică. În urma iradierii femelelor cu raze X, s-au produs translocații între cromozomii *X* și *Y*. Selecția masculilor născuți din femele iradiate, cu *XX* atașați (*XX/Y*), și avînd un marker recesiv în cromozomii *X*, a izolat pe aceia purtători de translocații *XY* alături de *Y* normal. Lungimea fragmentului din cromozomul *Y* translocat pe *X* a fost determinată în metafazele neuroblaștilor, studiindu-se în paralel spermatocitele pentru a se vedea situația buclelor individuale. S-au mai utilizat masculi (*X-Y/O*) obținuți în rarele cazuri de nondisjuncție. S-au obținut astfel patru situații prin „detașare" cu respectivele spermatocite, care arătau perturbațiile produse în structurile lor nucleare. Astfel s-a putut dovedi că buclele reprezintă mici segmente, cîteodată continue, ale cromozomului Y sau cromomere funcționale. Astfel, „filamentele" reprezintă un scunt segment sau cromozomul *Y* așezat în vîrful brațului lung pe o porțiune de 1/10 din lungimea acestora. Filamentele sînt urmate apoi de „conuri" și de pseudonucleol. Panglicile tubulare și măciucile sînt formate dintr-o porțiune proximală

Scanned with OKEN Scanner

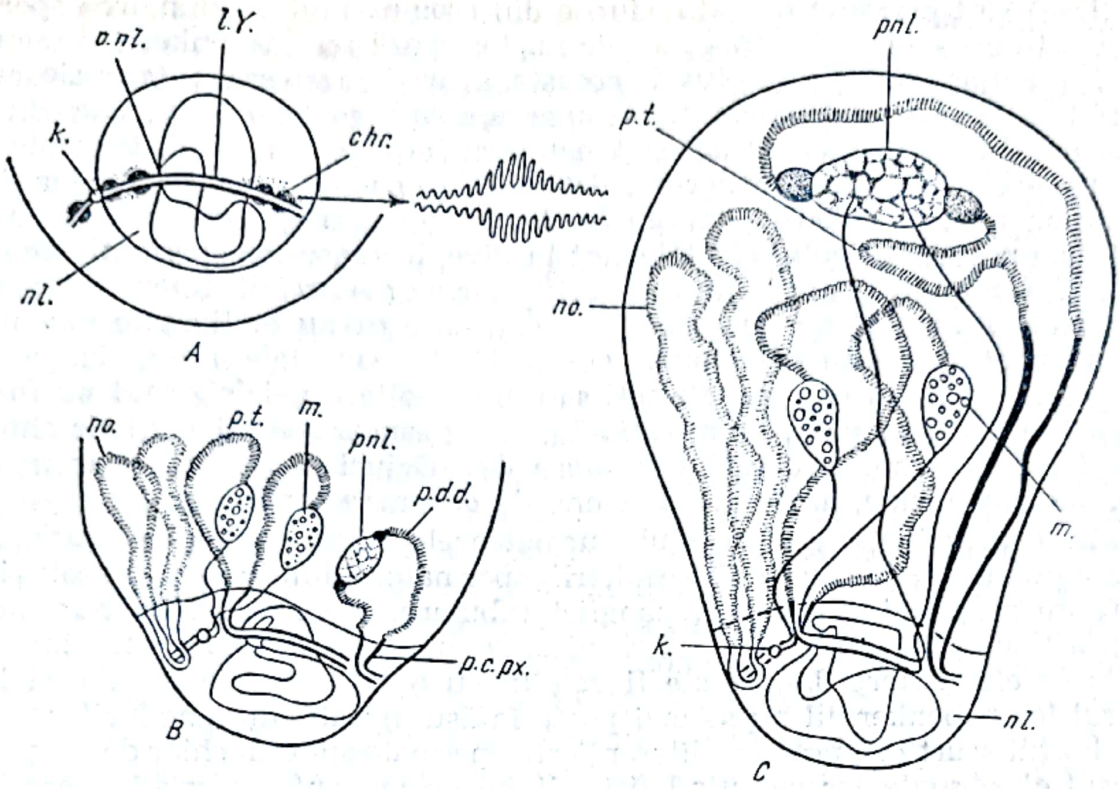


Fig. 157. A-C — diagrama formării buclelor cromozomului Y la *Drosophila hydei* în trei stadii diferite de creştere a spermatocitelor :
l.Y. — localizarea regiunilor care formează buclele pe cromozomul Y ; *m.* — măciuci ; *chr.* — cromomere ; *k.* — kinetocor ; *nl.* — nucleol ; *o.nl.* — organizator nucleolar ; *no.* — noduri ; *pnl.* — pseudonucleoli ; *p.t.* — panglici tubulare ; *p.d.d., p.c.px.* — părţi difuze distale şi părţi compacte proximale ale filamentelor (după W. Beermann, O. Hess, G. Meyer).

a cromozomului Y (2/10 din braţul lung), iar nodurile reprezintă o mică porţiune din braţul scurt (fig. 157).

Deci, segmente relativ scurte din cromozomul Y se transformă în bucle uriaşe asemănătoare cromozomilor „în perie de lampă" ai oocitelor de amfibieni şi peşti, restul cromozomului rămînînd netransformat. Cu alte cuvinte, porţiuni din DNA cromozomal este derulat formînd buclele sau puffing-urile a cîtorva cromomere. Experimental s-a dovedit că lipsa unor asemenea bucle gigante determină sterilitatea spermatozoizilor. Deci oricare regiune care dă bucle din cromozomul Y este necesară formării spermatozoidului matur ; şi invers, masculii cu XY au un spermatozoid de 13 mm, spre deosebire de masculii cu Y care au spermatozoidul de 6 mm. Lipsa cromozomului Y blochează dezvoltarea liniei seminale în stadiul de spermatocită de ordinul I. Prezenţa a cel puţin o pereche de bucle s-a dovedit a fi necesară desăvîrşirii meiozei şi formării spermatidei. Spermiogeneza ulterioară este determinată de integritatea cromozomului Y. De pildă, lipsa filamentelor, a pseudonucleolului, a măciucilor, a panglicilor tubulare şi a nodurilor din braţul scurt produce efecte precoce asupra diferenţierii spermatidei.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă sînt prezente numai nodurile din cromozomul Y, alungirea spermatidei nu se termină, mitocondriile nu formează un „nebenkern“ [1] și nu se diferențiază flagelii. În plus de aceasta, apar și degenerescențe nucleare, astfel încît testiculele în secțiune apar aproape goale. Invers, dacă lipsesc nodurile din brațul scurt și kinetocorul cromozomului Y, testiculele conțin spermatide în degenerare, datorită incapacității mitocondriilor de a forma un „nebenkern“ unitar. În deficiențele care afectează filamentele sau pseudonucleolul efectele sînt tardive, în sensul că spermatidele se dezvoltă normal pînă în faza sincițială. Spermatozoizii tineri nu sînt complet alungiți și nu au mobilitate. Cu toate că nu le lipsește nici un constituent citoplasmatic, totuși spermatidele sînt aberante, în sensul că flagelii sînt complet absenți sau nedezvoltați, nebenkernul nu formează o spiră în piesa intermediară și nu formează corpi paracristalini. Cînd lipsesc toate structurile în afară de măciuci și noduri, apar malformații în nucleu, acroblast și semne de degenerescență precoce.

În concluzie, se pot formula următoarele despre acțiunea buclelor cromozomului Y asupra diferențierii spermatozoidului : deficiențele în diferite structuri (filamente, panglici tubulare, măciuci, pseudonucleoli, conuri) produc anomalii în organizarea normală a spermatozoidului (fibrele elementare 9 + 2 ale flagelului au o dispoziție anormală și în jurul lor nebenkernul nu se mai poate înfășura) ; absența „nodurilor“ de pe brațul scurt compromite diferențierea spermatozoidului chiar de la începutul ei, absența lor neputînd fi suplinită de prezența celorlalte perechi de bucle ; filamentele și „nodurile“ permit o dezvoltare mai bună decît în cazul nodurilor singure. Dar dacă filamentele sînt utile în stadiile timpurii ale spermatogenezei, ele nu sînt indispensabile.

S-a constatat că se pot forma spermatozoizi aproape maturi în lipsa filamentelor, avînd numai „noduri“ și „măciuci“; deci funcția unei perechi de bucle poate fi suplinită de către alta. În orice caz, dacă se recombină într-un întreg fragmente din cromozomul Y, așa încît să existe toți componenții genetici ai cromozomilor Y, masculii sînt fertili și spermatozoizii se diferențiază normal. S-a studiat încorporarea uridinei —^{3}H în buclele acestui cromozom și s-a constatat că ea are loc de la o extremitate a buclei și se întinde, treptat, spre cealaltă extremitate pe măsură ce se mărește durata de incubație cu precursorul radioactiv al ARN. Foarte posibil că numai pe o scurtă porțiune din buclă are loc transcripția *m*-ARN, iar restul buclei are rolul de a „împacheta“ ARN-ul cu proteinele bazice, sub forma ribonucleoproteinelor.

ADN-ul, în cursul maturației oocitelor, a fost observat de J. Brachet cum migrează din nucleoli spre cortexul celulei atît la batracieni, cît și la echinoderme. Deci, în decursul maturației, organizatorii nucleolari sînt eliminați în citoplasmă. J. Gurdon (1967, 1968) a demonstrat, pe de altă parte, că nuclei adulți injectați în oocite pe cale de maturație prezintă o replicare activă. Mai mult chiar, simpla injectare de ADN nativ sau denaturat de la celule animale sau vegetale în oocitele mature determină acest ADN să se replice.

Devine limpede că maturația oului este marcată printr-o sinteză sau activare a unui factor de maturație care servește la replicarea ADN și

[1] Corpuscul juxtanuclear.

care are o specificitate mică. S-a reușit chiar să se măsoare creșterea cantității de ADN, care variază de la 0,05 la 0,06 μg/oocită. În timp ce timidina nu se mai încorporează în oocitele mature, tratarea acestora cu hormoni hipofizari sau cu progesteron induce o sinteză de ADN ; se poate observa un „pic" radioactiv în omogenate, iar pe autoradiografii se vede marcajul în carioplasmă și în plachetele viteline. Pe de altă parte, tratarea oocitelor cu hidroxiuree (inhibitor al sintezei ADN) nu numai că nu împiedică formarea granulelor Feulgen+ dar ușurează chiar și maturarea oocitei. Acest fapt curios impune cercetări mult mai amănunțite, deoarece hidroxiureea are influență și asupra citoplasmei în sensul formării citosterilor, a mitozelor pluricentrice, a dedublării fusurilor etc. atît la oocitele pe cale de maturare, cît și la blastomerele morulelor. De asemenea, sub influența hidroxiureei, cromozomii oocitelor se umflă și se decondensează, devin intens Feulgen +, asemănîndu-se cu cromozomii telofazici ai morulelor. Acest lucru a determinat pe J. Brachet și M. Geuskens (1968) să se gîndească la o derepresie genică. Și tocmai datorită acestei derepresii, atît hidroxiureea cît și maturația normală oferă același tablou al începutului de maturitate ovocitară : se rupe membrana nucleului dinspre centrul oocitei, se condensează cromozomii și apare fusul de diviziune. Dar și actinomicina, ca și hormonii sexuali, produce asupra oocitelor mature fragmentarea nucleolilor, condensarea cromozomilor „în perie de lampă" sau „plumoși" și apariția organizatorilor nucleolari sub o formă histochimic decelabilă, cu toate că în final se ajunge la blocarea maturației. Probabil că, în mod normal, maturația înseamnă apariția unui represor al sintezei *r*-ARN care se combină numai cu *r*-ADN din organizatorul nucleolar, provocînd dezagregarea nucleolilor. După M. Crippa este vorba de o proteină acidă care se combină selectiv cu *r*-ADN.

În oocite mai există și o mare cantitate de ADN citoplasmatic care, la aricii de mare și la anure, reprezintă cantitatea de ADN din 3900—25 000 de nuclei diploizi ai aceleiași specii. L. Piko (1967) apreciază că 2/3 din ADN-ul citoplasmatic al echinodermelor se află în mitocondrii (ADN circular) și 1/3 în vitelus (ADN filamentos). La amfibieni, 80% din ADN se găsește în plachetele viteline și poate fi ușor detectabil histochimic prin actinomicină —^{3}H ; aici se află strîns legat de fosfoproteinele plachetelor de care poate fi eliberat și dozat prin tratare la cald cu o soluție de acid percloric sau prin tratamente enzimatice (tripsină, papainã, pronază). Moleculele acestui ADN sînt foarte heterogene, diferind în ceea ce privește compoziția lor în baze de ale ADN-ului nuclear, cu toate că au aceeași densitate optică (1,699 g/cm^3). Ele se prezintă ca filamente de 0,67—22,6 μ lungime, cu o G.M. de 1,3—43 $\times$ 10^6 daltoni. Dozajele chimice făcute după tratarea cu acid percloric la cald arată că în vitelusul ouălor virgine nu se găsesc decît 40% din ADN-ul total. Această cantitate relativ mică este atît de strîns legată de proteinele viteline, încît nu poate fi extrasă prin acțiuni enzimatice. Oocitele peritoneale, mature și neacoperite de celule foliculare, au 65% din ADN-ul total, care poate fi și extras. Mai curios este faptul că trecerea prin oviduct produce modificări ale vitelusului în sensul că se dozează 50% din ADN-ul total în supernatant, după sedimentarea mitocondriilor și vite-

Scanned with OKEN Scanner

lusului, în timp ce în omogenatele de oocite peritoneale se găsesc numai 15% din ADN-ul total, în supernatant. Această trecere prin oviduct produce, deci, o creştere a solubilităţii ADN-ului vitelin, care este concomitentă cu încărcarea celulelor în CO_2.

ADN-ul vitelin, ca şi fosfoproteinele granulelor de vitelus, provin din ficat în cursul oogenezei. Fosfoproteinele sînt sintetizate de ergastoplasma hepatocitelor şi se leagă cu ADN-ul rezultat din picnozele nucleilor hepatici şi eritrocitari din preajma sinusurilor sanguine. De aici trec prin torentul circulator şi, ajungînd la gonade, sînt pinocitate de oocite. În ele complexul ADN-fosfoproteine va constitui plachetele viteline. Sînt observaţii după care plachetele se formează chiar în interiorul mitocondriilor. J. Brachet (1971) susţine că ADN-ul vitelin joacă rol în viteloliză sau, în urma degradării sale, în replicarea ADN-ului din timpul dezvoltării embrionare ulterioare. Problema aceasta rămîne deschisă. Oocitele în timpul creşterii mari prezintă o rată pronunţată a sintezei ARN. În primul rînd se sintetizează *r*-ARN. Replicarea ADN-ului organizatorului nucleolar (1500 nucleoli la amfibieni, care se găsesc sub forma circulară în nucleolii periferici) asigură transcripţia a 70% din totalul ARN-ului celulei. Astfel, în nucleu apar particule mai mici ca ribozomii, între 30—55S, iar oocitele foarte tinere au în citoplasmă un material fibrilar fin, provenit din nucleoli. Asemenea precursori ribozomali în care ARN este „împachetat" cu proteine bazice au o constantă de sedimentare mică, de 5 şi 15S.

M. Varo a arătat că în nucleolii oocitari atît ADN cît şi ARN sînt legaţi de circa 20 de proteine bazice de tipul histonelor, şi materialul lor ribozomal trece prin porii membranei nucleare. P. Ford (1970) a putut găsi în oocitele foarte tinere, care în orice caz nu au ribozomi tipici, nişte particule de 42S compuse din 80% proteine şi 20% ARN, cu o constantă de sedimentare mică, de numai 4,75S. De asemenea, se mai sintetizează *t*-ARN şi *m*-ARN, ultimul de-a lungul buclelor cromozomilor „în perie de lampă". Asemenea ARN, foarte heterogen, serveşte în sintezele proteice din timpul creşterii mari a oocitei, cînd se elaborează proteine şi, mai ales, enzime, necesare abia mult mai tîrziu în cursul dezvoltării embrionare.

S-a constatat experimental că se acumulează în oocitele mature şi în ouăle virgine o cantitate de ARN „templat" capabil să stimuleze sintezele de proteine în sistemele acelulare cu ribozomi de *Escherichia coli*. Acest ARN „templat" corespunde la 2—5% din ARN-ul total, valoare ce rămîne constantă în tot cursul dezvoltării embrionare. Dacă rămîne de verificat existenţa sintezei ADN sub acţiunea hormonilor în timpul maturaţiei, în schimb se ştie precis că se produc 1—6 μg/oocită de ARN heterogen (amestec de mai mulţi *m*-ARN). Probabil că acest ARN heterogen dirijează sinteza enzimelor necesare iniţierii maturaţiei, adică „deşirării" membranei nucleare, dezorganizării nucleolului, condensării cromozomilor şi formării fusului. Un argument în favoarea acestei ipoteze este dat de faptul că actinomicina inhibă începerea maturaţiei indusă „in vitro" cu gonadotropine. Totuşi, cantitatea de ARN „templat" produsă în timpul

Scanned with OKEN Scanner

maturației este mult mai mică decît în ouăle virgine, ceea ce înseamnă că și în ouăle virgine are loc o sinteză de asemenea ARN. J. Brachet (1970) crede că ARN-urile „templat" pot interveni și în stadiile ulterioare ale dezvoltării, deoarece migrează și se acumulează la polul vegetativ, în proteinele determinantului germinal.

T. Dettlaff (1964), studiind „in vitro" maturația la amfibieni și acipenseride, constată că prima reacție este apariția unor invaginări mari la partea bazală a membranei nucleare pline cu ribozomi, mitocondrii și glicogen. După ruperea membranei nucleare acest material se amestecă cu carioplasma. Acumularea materialului din invaginațiile nucleare este necesar maturației, întrucît el se poate acumula la baza nucleului chiar și sub influența hidroxiureei, dar este împiedicat să apară la tratarea ouălor, pe punctul de a-și începe maturarea, cu actinomicină, puromicină sau ciclohexîmidă. Polizomii din acest material provin, bineînțeles, tot din buclele cromozomilor plumoși și, trecînd în citoplasmă, rămîn localizați la baza nucleului. Aici se sintetizează proteine care dezorganizează membrana nucleară. Cantitatea lor de 0,5 μg/oocită este constantă în timpul maturației și are rol să represeze sinteza *r*-ARN și să derepreseze pe aceea a ADN. Aceste acțiuni pot fi guvernate de o ADN-polimerază citoplasmatică, pentru sinteza ADN și de proteina acidă a lui Crippa, pentru represia sintezei ARN. Aceiași polizomi de la baza nucleului intervin și în sinteza masivă a altor proteine, care poate fi blocată cu puromicină, împiedicîndu-se iar ruperea membranei nucleare.

Această activitate a fost cercetată sistematic de către R. Ecker și L. Smith (1968—1970), care au constatat că proteosinteza este foarte mică la oocita crescută dar se mărește la 0,5 μg, cum s-a arătat mai sus, și rămîne constantă în timpul maturației, chiar dacă oul este anucleat. Ea nu este afectată nici de fecundarea oului nici de activare, ceea ce înseamnă că polizomii s-au format mai înainte. La amfibieni represia sintezei proteinelor are loc la sfîrșitul creșterii mari a oocitei, iar derepresia este anulată în timpul maturației. La echinoderme proteosinteza este represată în timpul maturației și restabilită odată cu fecundația. Aceste proteine iau parte la formarea microtubulilor, asterilor și fusului. Injectarea unor nuclei străini în oocite, cu sau fără pronucleu, dar tratate cu progesteron, produce clivarea, fapt care l-a determinat pe Smith să presupună ca indispensabil clivării amestecul dintre citoplasmă și sucul nuclear.

J. Gurdon (1968) a injectat nuclei neurali în ouă virgine, anucleate și a observat formarea fusurilor și clivajelor. Există, deci, o interacțiune între sucul nuclear și citoplasmă, care concură la formarea asterilor și a diviziunilor celulare. Pe de altă parte, tot Smith și Ecker (1970) au arătat, prin metoda autoradiografică, cum proteinele citoplasmatice migrează în nucleu în timpul segmentării oului. Și tot autorii mai sus citați (1970) au demonstrat că citoplasma anucleată a ouălor de amfibieni se poate matura în sensul răspunsului pozitiv la progesteron, se activează prin înțepare și sintetizează după aceea proteine, datorită tocmai ribonucleoproteinelor ei.

Scanned with OKEN Scanner

12.4. SINTEZA MACROMOLECULELOR PROTEICE, ÎN ABSENȚA NUCLEULUI

Se continuă într-un ritm normal, mai multe ore. Ouăle anucleate ale echinodermelor nu încorporează decît foarte slab aminoacizi în proteine, în schimb activarea acestor ouă determină încorporarea abundentă de aminoacizi. Tratamentul cu puromicină oprește încorporarea, ceea ce denotă o sinteză proteică abundentă în asemenea citoplasme. Există un caz elocvent la prosobranhiatul *Ilyanassa* unde blastomerul 4D (endodermul) prezintă un lob plin cu lipide, care poate fi ușor separat. Acest lob polar mai poate încorpora aminoacizi în proteinele sale timp de 24 ore de la izolarea de restul celulei endodermice. Sintezele din el au loc la nivelul polizomilor pe care-i conține. Faptul se explică prin aceea că ARN-ul „templat" sintetizat în oogeneză se stochează în citoplasmă sub o formă stabilă. În urma activării ouălor de echinoderme sau a acțiunii hormonilor la batracieni, mesagerii se unesc cu ribozomii, formînd *polizomi funcționali.*

C. Chamberlain (1970) a descoperit în ouăle anucleate și activate o mare sinteză de ARN (15S) pe care o pune pe seama mitocondriilor. Încorporarea uridinei are loc în citoplasma fragmentelor anucleate de *Ilyanassa,* în oocitele cu nucleul distrus de la pești și în citoplasma oocitelor de *Xenopus.* Deci ADN-ul citoplasmatic (mitocondrial și vitelin) este capabil de transcripția unor mesaje genetice foarte precise, cu rol bine determinat în morfogeneză. Dealtfel, ADN-ul citoplasmatic este capabil de replicare, deoarece în fragmentele anucleate ale ouălor de echinoderme această sinteză crește de 6 ori după activarea lor partenogenetică.

Cum se poate deduce, atît ADN-ul cît și ARN-ul sînt capabili să se sintetizeze în citoplasma lipsită de nucleu, în aceleași condiții de activare partenogenetică a ouălor anucleate, care este necesară și pentru sinteza proteinelor. Într-adevăr, în fragmentele anucleate ale ouălor de arici de mare nu are loc nici o sinteză de acizi nucleici, dacă ele nu sînt supuse în prealabil la un „șoc" de apă de mare hipertonică, cu rol să le activeze și să producă reacția corticală, adică spargerea vacuolelor corticale și formarea unei noi plasmaleme (numită *membrană de fecundație*).

12.5. ACTIVITATEA GENICĂ ÎN TIMPUL FECUNDAȚIEI

Fecundația este marcată printr-o sinteză imediată de ADN cromozomal, întrucît amîndoi pronucleii (♂ și ♀) încep să încorporeze timidina —^{3}H. J. Gurdon (1968) a demonstrat acest fapt inoculînd nuclei de organe adulte care, în mod normal, nu încorporau precursorii marcați ai ADN în ouă fecundate ; or, aceștia căpătau imediat facultatea de a încorpora. Deci, în citoplasma ouălor fecundate, există o ADN-polimerază activă cu care se sintetizează ADN, chiar și prin injectarea unui ADN străin. Cu acest prilej s-a putut stabili precis că ADN-polimeraza citoplasmatică trece în nuclei odată cu fecundația și acest aport continuă în tot timpul segmentării.

Scanned with OKEN Scanner

Deci, citoplasma controlează diviziunile blastomerelor. Dacă ARN-ul nu se sintetizează în urma fecundației, în schimb sinteza proteinelor crește brusc și mult, așa cum a descoperit A. Monroy (1960). Această sinteză trebuie privită numai ca o „traducere" nu și ca o „transcripție" deoarece, cum s-a mai arătat, ea are loc și în ouăle activate partenogenetic. Dacă sinteza nu începe decît după fecundație, înseamnă că este oprită de un mecanism de control.

S-au făcut multe presupuneri cu privire la acest mecanism, printre care citățm : mascarea *m*-ARN stabil ; blocarea ribozomilor cu proteine care-i împiedică să se combine cu alți ribozomi și să formeze polizomi ; incompatibilitatea ribozomilor de a se combina cu *m*-ARN matern ; prezența unui inhibitor solubil ; lipsa activității aminoacil-*t*-ARN-sintetazei ; lipsa factorilor de inițiere a lanțurilor polipeptidice etc. Totuși, A. Tyler (1968) și A. Monroy au putut surprinde în ouăle virgine o populație mică de polizomi activi, cu toată represia biosintezei proteice. Derepresia ar putea avea loc prin creșterea consumului de oxigen din momentul fecundației, activarea NAD-kinazei și creșterea cantității de NADP care stimulează proteosinteza ; sau poate, și mai simplu, după cum sugerează experiențele lui F. Mac Kintosh și E. Bell care au scos CO_2 din apa de mare cu ouă virgine de echinoderme, declanșînd proteosinteza. Această proteosinteză merge paralel cu consumul de oxigen, fapt care subliniază că producerea de energie este un factor determinant în reglajul sintezelor.

Segmentarea oului se caracterizează printr-o atît de rapidă încorporare a timidinei -^{3}H în ADN nuclear, încît nici nu mai există perioada G_1 ce precede faza *S* de replicare a ADN-ului cromozomal. Dar acum apare și o reductază ribonucleotidică ce face posibilă sinteza ADN pe baza uridinei.

Încorporarea ribonucleosidelor în ADN-ul nuclear începe, deci, din perioada segmentării și se continuă pînă în timpul formării blastulei, cu o intensitate crescută. Enzima poate fi inhibată cu *d*-adenozină și hidroxiuree, fiind sensibilă la raze X, cicloheximidă, streptoocitocină-C. Blocarea timidilat-sintetazei cu fluorodezoxiuridină inhibă, de asemenea, dezvoltarea. Adausul timidinei, alături de *d*-adenozină, corijează efectul de inhibiție al sintezei ADN, obținîndu-se chiar larve înotătoare (pluteus). De data aceasta, funcționează calea normală cu precursori ai ADN de care se pare că duc lipsă blastomerele. Aviditatea lor pentru ADN este atît de mare încît folosesc chiar ADN de *E. coli* pe care-l încorporează netransformat în nuclei.

După prima diviziune de segmentație reîncepe sinteza de *m*-ARN-uri cu formarea unor noi populații de polizomi. Aceste ARN-uri sînt complementare cu ADN-ul și, de aceea, se mai numesc *D*-ARN, fiind sintetizați de nucleu și trecuți apoi în citoplasmă. Ei au constanta de sedimentare 20S, fiind identici cu *m*-ARN din ouăle nefecundate. Vechii polizomi sînt folosiți pînă spre sfîrșitul stadiului de blastulă, cînd apare o altă populație de *m*-ARN, precum și precursori nucleolari ai *r*-ARN.

M. Crippa a stabilit că *m*-ARN dinaintea fecundației și cel format în timpul segmentării formează polizomi funcționali cu ribozomii formați în oogeneză. Între stadiile de blastulă și gastrulă crește și transcripția ADN-ului mitocondrial. În această perioadă, transcripția

Scanned with OKEN Scanner

ADN nuclear este mai mică decît replicarea aceluiași ADN, producîndu-se o scădere a procentajului de ARN per genom. Populațiile de *m*-ARN formate în timpul segmentării servesc la formarea fusurilor și asterilor diviziunii celulare, pînă la gastrulație.

Interesant este faptul că s-a reușit izolarea a 3 ARN-polimeraze, și că s-au separat din blastule de arici de mare două feluri de polizomi : ușori și grei. Polizomii ușori, cu o constantă de sedimentare de 9S sintetizează histone (o jumătate din cantitatea proteinelor sintetizate în timpul segmentării sînt histone care pot servi la blocajul transcripției). Dealtfel, histonele blochează în mod experimental dezvoltarea în stadiul de blastulă, iar V. Vorobiev (1969) a descoperit că ele se formează cu viteze diferite și au proprietăți diferite în cursul dezvoltării la pești și echinoderme. Din proteinele formate în citoplasmă 40—60% se acumulează în acromozomi, fiind acidosolubile, dar rolul lor în morfogeneză va trebui precizat. La batracieni însă, sinteza acizilor ribonucleici mesageri nu începe decît la sfîrșitul segmentării, cînd crește cantitatea ARN-polimerazei. Blastulele avansate au o mare cantitate de acizi ribonucleici *m*-ARN care vor fi folosiți în timpul gastrulației. Tot atunci apare și *r*-ARN și ribozomii noi.

Un lucru este clar și anume, atît echinodermele cît și batracienii răspund în același fel la inhibitorii sintezelor proteice și ribonucleice. Actinomicina nu împiedică segmentarea, astfel că embriogeneza se oprește abia la sfîrșitul gastrulației. Puromicina, cicloheximida, streptovitacina A. pactamicina, inhibînd sinteza proteică, opresc formarea fibrelor asteriene și fusoriale și, implicit, blochează imediat dezvoltarea. Dar antibioticele susmenționate au un spectru mult mai larg de acțiune care, la o analiză amănunțită (M. Genskens și F. Legros, 1970), determină apariția precoce a nucleolilor în nucleii blocați în interfază, inhibînd proteosinteza materialului nuclear, a sintezei ADN și a ARN pe seama uridinei și scăzînd simțitor sinteza ADN pe seama timidinei. Deci, mitozele repetate din timpul segmentării oului au loc în lipsa sintezei acizilor ribonucleici, deoarece ARN-ul „templat" format în timpul oogenezei și maturației este suficient ca să asigure prin proteinele produse toate diviziunile celulare. În schimb, acizii ribonucleici sintetizați la sfîrșitul segmentării vor servi în timpul gastrulației.

Gastrulația la amfibieni începe cînd blastula, de circa 15 000 de celule, începe să-și încetinească sinteza de ADN și să-și accelereze sinteza de ARN, concomitent cu mișcările morfogenetice, care plasează endoblastul și cordomezoblastul sub ectoblast, realizînd embrionul tridermic. După cum se știe, încă din oogeneză apare un *r*-ARN care, în timpul gastrulației, începe să se asambleze în ribozomi. Acum ^{32}P se încorporează atît în subunitățile 28S cît și în 18S. Odată cu gastrulația apar și nucleolii, iar ribozomii se distribuie după un gradient dorso-ventral și unul pol animal-pol vegetativ. Creșterea cantității de ribozomi se face destul de încet, așa încît, la sfîrșitul ontogeniei intracapsulare, cînd mormolocii se hrănesc pe cont propriu, cantitatea ribozomilor este dublă și de același fel cu aceea din oul virgin. Tot de la începutul gastrulației apare *t*-ARN cu o viteză mare de sinteză, întrucît merge în paralel cu aceea a ADN. Cum oocita conține 0,64 μg *t*-ARN și 4 μg *r*-ARN, în cursul gastrulației embrionul se îmbogățește mult mai repede în *t*-ARN decît în

Scanned with OKEN Scanner

r-ARN. Mai precis, pînă cînd să ajungă mormolocul să se hrănească cu alimente din afară, cantitatea de *t*-ARN crește de 30 × (ajungînd la 19,2 μg), iar a *r*-ARN numai odată (adică la 8 μg). De asemenea, crește foarte mult sinteza *D*-ARN (adică un acid ribonucleic cu o compoziție în baze asemănătoare cu a ADN compus din *m*-ARN și un ARN nuclear cu o reînnoire rapidă). Acest *D*-ARN, pe lîngă faptul că este nou sintetizat, este și complet deosebit de *r*-ARN-ul blastulei.

H. Denis (1971) a dovedit că genele care sînt active în cursul gastrulației sînt diferite de acelea care au funcționat în timpul oogenezei și au produs *D*-ARN (stabil) în oul matur și din timpul segmentării. Unele gene, care sînt active în cursul gastrulației, continuă să fie și după aceea, în restul dezvoltării, în timp ce alte gene încetează să funcționeze. Așa este cazul *D*-ARN care se sintetizează la începutul gastrulației și funcționează numai cîteva ore, pentru ca la mijlocul gastrulației să-și înceteze activitatea. Există, deci, gene cu activitate tranzitorie.

În nuclei s-a constatat că activitatea de transcripție detectată cu ajutorul uridinei -^{3}H începe chiar de la sfîrșitul segmentării și apoi în mod simultan în numeroase teritorii ale blastulei. Dar această sinteză are loc, după cum susține J. Brachet, de mai mult timp, după un gradient animal-vegetativ, ulterior și după unul dorso-ventral.

Embriologia experimentală caută să descopere factorii care realizează derepresia genelor în anumitele teritorii ale embrionului. Un prim indiciu în acest sens l-au constituit lucrările lui D. Curtis (1960) care a dovedit că morfogeneza formării buzei dorsale a blastoporului și inducția neurală sînt controlate de cortexul dorsal (cu „secera cenușie" de la *Rana*). Microinjecția cu uridină -^{3}H în ouăle nedivizate de *Xenopus*, al cărui cortex dorsal fusese rănit prin înțepare, dovedește o slăbire a sintezei ARN nuclear din buza dorsală superioară a blastoporului, premergătoare diferitelor malformații și cel mai des blocării dezvoltării în stadiul de blastulă. O mică excizie a cortexului dorsal produce o inhibiție de lungă durată a sintezei ARN din regiunea organizatorului primar al lui Spemann. Dacă citoplasma corticală controlează dezvoltarea într-o anumită etapă, aceasta o face prin intermediul nucleilor. Leziunile plasmalemei produc anomalii mitotice : pluricentrie și aneuploidie, adică o perturbare puternică a genomului care, după A. Curtis, este letală.

Dacă se centrifughează ouă nesegmentate de broască și se lasă să se dezvolte pînă în stadiul de gastrulă, se vede cum celulele de la polul centripet, bogate în ARN, lipide și glicogen, au nucleoli mari, iar la polul centrifug nucleul practic nu are nucleol. La acest pol celulele au o citoplasmă bogată în granule de vitelus. Deci cantitatea de citoplasmă cu vitelus întîrzie funcționarea organizatorului nucleolar. Totuși, și în gastrulele normale, sinteza *r*-ARN este mai tîrzie în endoblastul bogat în vitelus decît în alte părți ale embrionului.

Sînt cunoscute observații mai vechi după care hibrizii dintre specii sau genuri diferite sînt letali, iar embrionii născuți din încrucișări interspecifice mor la începutul gastrulației.

La echinoderme a fost bine studiată hibridarea genurilor *Paracentrotus* femel × *Arbacia* mascul, care dă larve letale la începutul gastrulației. În aceste condiții se constată trecerea ADN din nucleu în citoplasmă

Scanned with OKEN Scanner

într-o cantitate mare şi a unei foarte mici cantităţi de ARN. Deci, transcripţia se încetineşte deoarece genele îşi scad activitatea. Ca să se producă fenomenele gastrulaţiei trebuie să existe un raport de „competenţă" între ADN-ul nuclear şi citoplasmă. Şi pentru că această „armonie" dintre ADN-citoplasmă nu există la hibrizii letali, transcrierea ARN în acest caz ne va da informaţii chiar asupra reglării activităţii genice. Embrionii echinodermelor se pretează foarte bine unor asemenea cercetări deoarece încorporează uşor precursorii marcaţi ai acizilor nucleici, în schimb ai batracienilor sînt impermeabili.

Hibridul letal dintre *Arbacia lixula* ♂ şi *Paracentrotus lividus* ♀ se opreşte în dezvoltare în stadiul de gastrulă tînără, mai precis nu trăieşte ca stereoblastulă decît 24 de ore. În acest caz nu se opreşte sinteza ADN, ARN, a proteinelor şi a antigenelor de tip patern. În schimb, prin hibridări moleculare, se constată că asemenea hibrizi letali au de două ori şi jumătate mai mult ADN matern decît patern. Scăderea ADN patern are loc prin eliminări de cromozomi la sfîrşitul segmentării. Dar atîta vreme cît sînt două cromatine, maternă şi paternă, în combinaţii de hibridări care să depăşească stadiul critic al gastrulaţiei, atunci există şi enzime hibride (fosfataze, arilsulfataze, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza). Hibrizii letali ai batracienilor au caracteristic o mare acumulare de ARN, o slabă activitate a ARN-polimerazei şi folosirea în mică măsură a uridinei în sinteza ADN. Dar ceea ce frapează sînt autoradiografiile în care se vede cum s-a pierdut coordonarea sintezei ADN ; numai grupe izolate de celule încorporează uridina —^{3}H.

J. Woodland şi J. Gurdon (1969) au abordat problema biosintezei ARN printr-o metodologie pur experimentală. Injectînd nuclei diploizi de *Discoglossus* în ouă virgine anucleate de *Xenopus*, ei au obţinut blocajul în stadiul de blastulă, cu sinteza normală de ARN şi ADN pînă în momentul critic. Dar n-au putut detecta nici o urmă de *r*-ADN, întrucît organizatorii nucleolari de la *Discoglossus* nu funcţionează într-o citoplasmă străină. Chiar şi biosintezele *m*-ARN şi *t*-ARN sînt încetinite, poate datorită unor inhibitori. Este suficient să se disocieze blastulele în blastomere şi acestea recapătă capacitatea de a se diferenţia. Se ştie că proprietăţile plasmalemei sînt alterate la hibrizii letali şi aceasta tocmai datorită inhibitorilor pe care disocierea „îi spală". După un timp însă alterarea devine ireversibilă şi, de aceea, blastomerele se reagregă greu după disociere. Pe de altă parte, letalitatea unor mutante de *axolot* poate fi preîntîmpinată prin injecţii, în ouăle pe cale de segmentare, a sucului nuclear luat cu micropipete din oocitele unor femele normale.

J. Brachet şi H. Denis au inaugurat recent o serie de experienţe de hibridare competitivă între ARN-ul gastrulei blocate şi acela al embrionilor normali de aceeaşi vîrstă, în scopul de a cunoaşte mai bine căile diferenţierii timpurii şi influenţa citoplasmei asupra nucleilor. Într-o primă experienţă, se compară ARN-ul marcat de la *Paracentrotus lividus* cu ARN-ul nemarcat de la aceeaşi specie. Se incubează la 60°C 29 μg (36 000 cpm) de ARN marcat cu uridină —^{3}H (de la gastrule de 24—46 ore dezvoltare), cu 13 μg ADN de *Paracentrotus lividus* la care se adaugă cantităţi crescute de ARN nemarcat de *Escherichia coli*, *r*-ARN de *Paracentrotus lividus*, ARN oocitar şi intestinal de la pluteus şi de la gastrule tot de la aceeaşi specie. Deci, în prezenţa unei cantităţi fixe de

Scanned with OKEN Scanner

ADN, se incubează cantităţi crescute de ARN neradioactiv, competitiv cu cantitatea constantă de ARN marcat (gastrulean) de aceeaşi origine. Se constată cum ARN-ul marcat se hibridează mai mult sau mai puţin cu ADN-ul, după cum este scos din competiţie de ceilalţi acizi ribonucleici nemarcaţi. Competiţia acizilor ribonucleici nemarcaţi este în funcţie de situs-urile complementare ale ADN. La început toate aceste „site" sînt ocupate de ARN marcat dar, pe măsură ce creşte concentraţia acizilor ribonucleici nemarcaţi adăugaţi, aceştia înlocuiesc progresiv pe cel marcat din hibridul ADN-ARN. Astfel, ARN-ul de *Escherichia coli* nu are secvenţe complementare cu ADN-ul de arici de mare şi, de aceea, nu scoate din hibridul ADN-ARN nimic. Acidul ribonucleic ribozomal de arici de mare are foarte puţine secvenţe complementare cu hibridul ADN-ARN marcat căruia îi scade radioactivitatea numai la 83%. În schimb, ARN-ul din ouă şi din intestin îi scade radioactivitatea la 60%, cel din plutus la 40% şi cel mai mult acela din gastrulă la 30%.

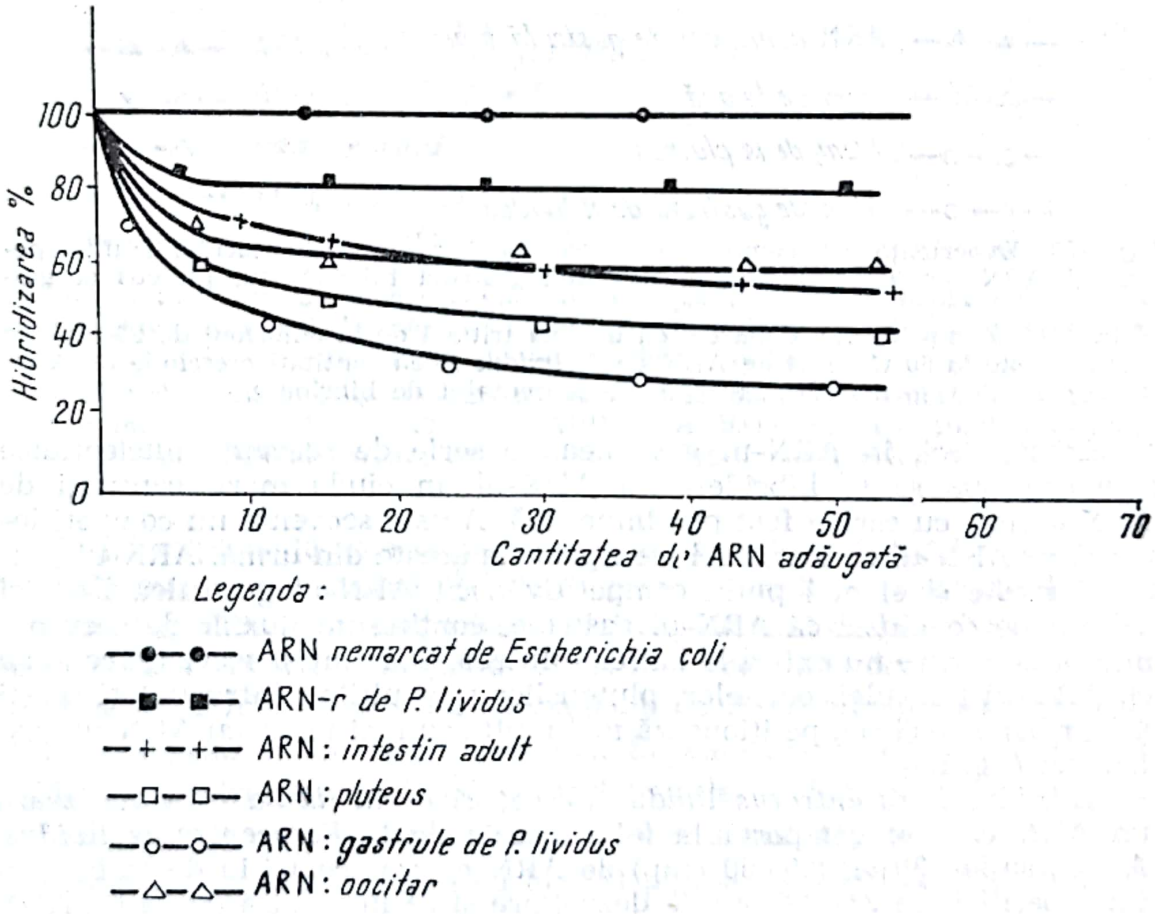


Fig. 158. Experienţa de competiţie dintre ARN marcat al gastrulei de *Paracentrotus lividus* şi ARN nemarcat de diferite origini : de *Escherichia coli*, ARN ribozomal de *P. lividus*, ARN oocitar, ARN de intestin adult, de plutei şi de gastrule de *P. lividus* :

29 µg (36 000 cmp) de ARN marcat cu uridină tritiată luat de la embrioni de 24—26 ore dezvoltare se amestecă cu 13 µg de ADN de *P. lividus*, se incubează la 60°C şi se adaugă cantităţi crescînde de ARN nemarcat ;
890 cpm = procentajul de hibridare.

Scanned with OKEN Scanner

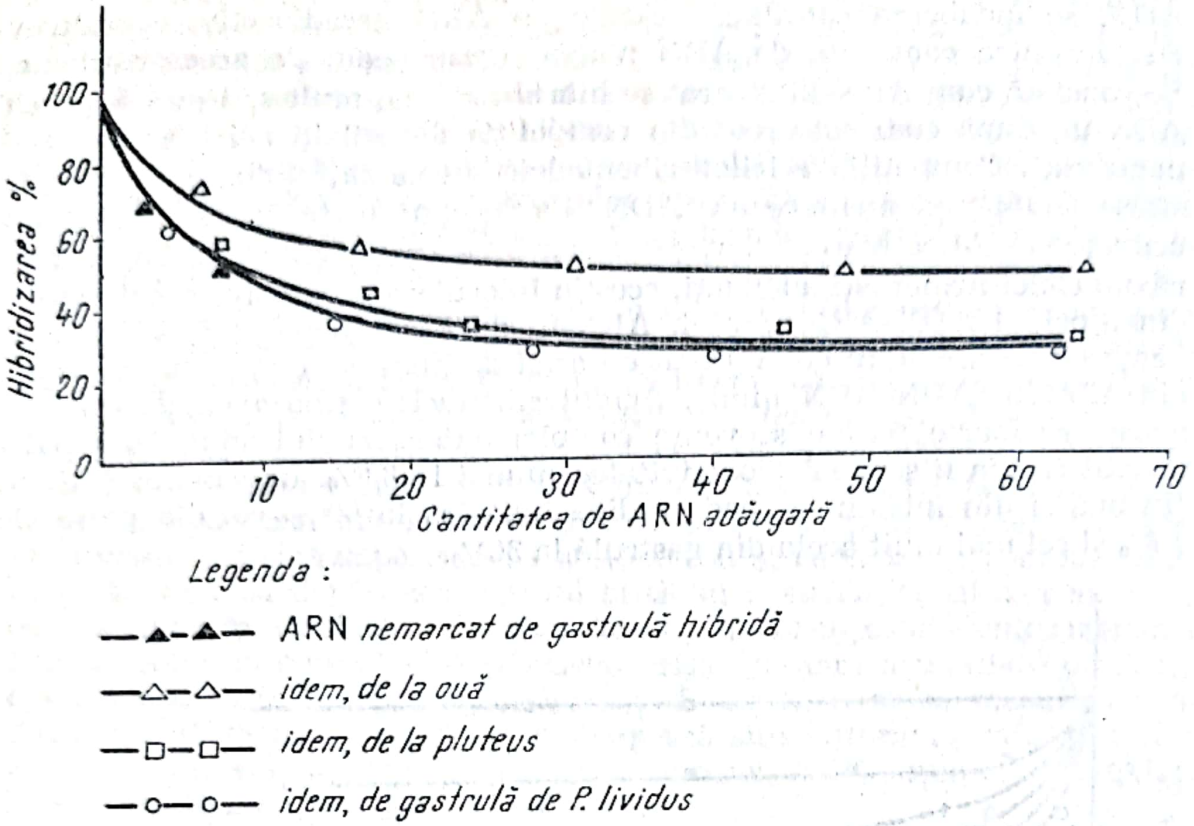


Fig. 159. Experienţa de competiţie dintre ARN marcat al hibridului interspecific şi ARN nemarcat de origini diferite : gastrulă hibridă, ou, pluteus şi gastrulă de *P. lividus* :

30 µg (29 000 cmp) de ARN marcat cu uridină tritiată de la embrioni de 23—26 ore sînt incubate la 60°C cu 14 µg ADN de *P. lividus* şi cu cantităţi crescînde de ARN nemarcat ; 210 cpm = procentajul de hibridare.

Există, deci, în ARN-ul gastrulean o serie de secvenţe nucleotidice care continuă să se hibrideze cu ADN-ul, în ciuda marii cantităţi de ARN oocitar cu care a fost pus împreună. Aceste secvenţe nu competiţionează cu ARN-ul oocitar, deci ele lipsesc la acesta din urmă. ARN-ul pluteuşilor este şi el mai puţin competitiv decît ARN-ul gastrulei. De aici se impune concluzia că ARN-ul gastrulei conţine un număr de secvenţe nucleotidice care nu există la larvele pluteus. Dar sînt şi secvenţe comune cu ARN-ul gastrulei, oocitelor, pluteuşilor şi adulţilor, întrucît toţi aceşti acizi ribonucleici competiţionează mai mult sau mai puţin cu ARN-ul gastrulelor (fig. 158).

Hibridul *Paracentrotus lividus* ♀ × *Arbacia lixula* sintetizează un ARN care se comportă la fel ca acela de la *Paracentrotus lividus*. Astfel, se iau 30 µg (29 000 cmp) de ARN marcat cu tritiu de la hibrizii interspecifici, de 23—26 ore de dezvoltare şi se incubează cu 14 µg ADN de *Paracentrotus lividus* la 60°C, împreună cu cantităţi crescînde de ARN nemarcat de la gastrule hibride, ouă, pluteus şi gastrule de *Paracentrotus lividus*. ARN-ul gastrulelor normale este cel competitiv faţă de ARN-ul marcat de la hibrid. Ceilalţi acizi ribonucleici sînt mai puţin competitivi ca ARN-ul gastrulei, aşa că se poate spune că ARN-ul sintetizat de hibrizii interspecifici conţine secvenţe de nucleotide proprii gastrulelor normale, care nu se întîlnesc şi la alte stadii (fig. 159).

Scanned with OKEN Scanner

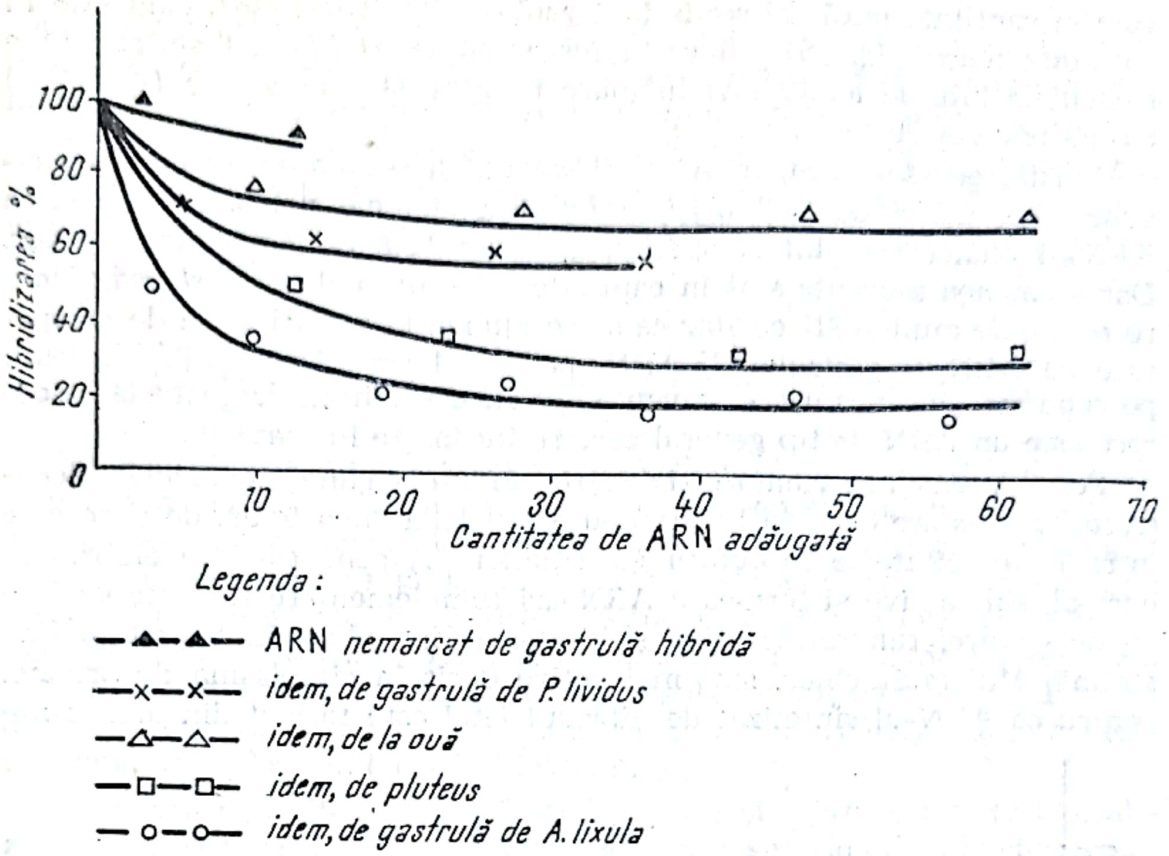


Fig. 160. Experienţa de competiţie dintre ARN marcat de gastrulă de *Arbacia lixula* şi ARN nemarcat de diferite origini : gastrulă hibridă, gastrulă de *P. lividus*, ouă, plutei şi gastrulă de *A. lixula* :

31 µg (39 000 cmp) de ARN marcat cu uridină tritiată de la embrioni de 23—26 ore sînt incubate la 60°C cu 13 µg de ADN de *A. lixula* şi cu cantităţi crescînde de ARN nemarcat ; 620 cmp = procentajul de hibridare.

O altă experienţă este aceea în care se amestecă 31 µg (39 000 cmp) de ARN marcat cu uridină -^{3}H de la gastrule de 23—26 ore de dezvoltare cu 13 µg ADN, amîndoi acizii nucleici provenind de la *Arbacia lixula*. Se incubează la 60°C, adăugîndu-se cantităţi crescînde de ARN nemarcat de la gastrule hibride şi gastrule normale de *Paracentrotus lividus*, ouă, pluteus şi gastrule de *Arbacia lixula*. Se constată aceeaşi prezenţă de *D*-ARN în gastrulele de *Arbacia*, ca şi în cele de *Paracentrotus*, a unui acid ribonucleic mesager care lipseşte în alte stadii (fig. 160).

Într-o ultimă experienţă, s-au luat 31 µg (29 000 cpm) de ARN marcat cu uridină -^{3}H de la gastrule hibride interspecifice letale (*Arbacia lixula* ♂ × *Paracentrotus lividus* ♀) şi s-au incubat la 60°C cu 12 µg ADN patern de *Arbacia*. Apoi s-au adăugat cantităţi crescînde de ARN nemarcat de gastrule hibride, de ouă şi de gastrule de *Arbacia*. De data aceasta, ARN-ul hibrid este slab competitiv faţă de ARN-ul gastrulei şi al pluteuşilor de *Arbacia*, iar al oocitelor este şi mai puţin competitiv cînd

este în cantitate mică. El scade însă radioactivitatea la 60% cînd este în cantitate mare (fig. 161). Aceasta înseamnă că *D*-ARN-ul sintetizat de gastrulele hibride letale este în mare măsură asemănător cu *D*-ARN-ul din gastrula de *Arbacia*.

Există, de asemenea, în ARN-ul oocitar şi secvenţe comune ale acizilor ribonucleici de la hibrizi şi de la gastrulele normale, pentru că ARN-ul ouălor este un competitor „serios" faţă de ARN-ul hibrizilor. Dar asemenea secvenţe sînt în cantitate mică în ouăle de *Arbacia*, deoarece trebuie mult ARN oocitar ca să se ajungă la acelaşi nivel de competiţie cu ARN-ul gastrulei. *D*-ARN, pe care-l sintetizează hibrizii letali pe genomul pattern, nu are secvenţe specifice stadiului de gastrulă, deoarece este un ARN de tip general care se întîlneşte în toate stadiile.

Fecundarea cu spermatozoizi de *Arbacia lixula* a unei oocite de *Paracentrotus lividus* are două influenţe opuse asupra a două feluri de gene care intră în activitate la începutul gastrulaţiei : 1) gene care, la embrionul normal, sînt active şi formează ARN-uri complementare în toate stadiile de dezvoltare, rămînînd active şi cînd sînt introduse într-o citoplasmă străină. Mai mult chiar, sînt mai active decît în citoplasma de origine, pentru că ARN-ul sintetizat de hibridul letal este format din mai multe

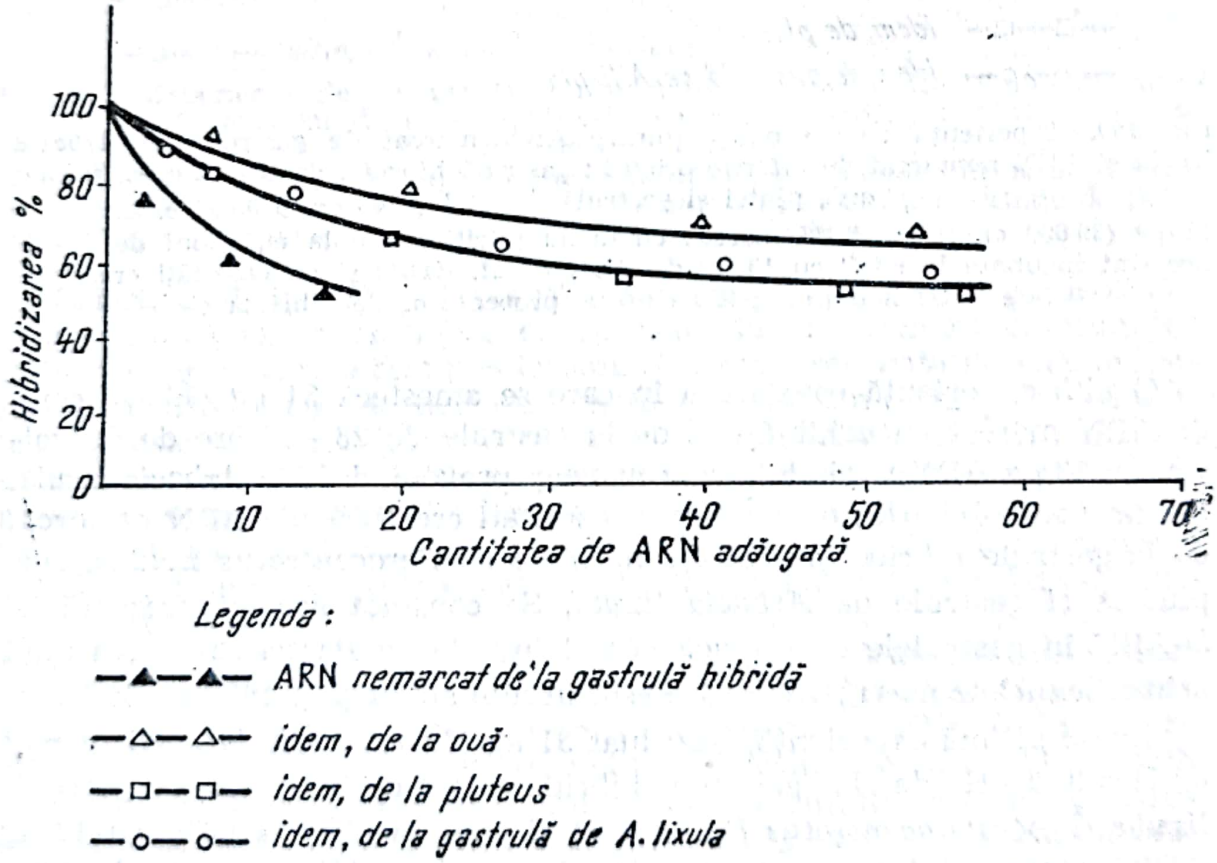


Fig. 161. Experienţa de competiţie dintre ARN marcat al hibridului interspecific şi ARN nemarcat de diferite origini :

30 µg (29 000 cmp) de ARN marcat cu uridină tritiată de la embrioni de 26 ore se incubează la 60°C cu 12 µg ADN de *A. lixula* şi cu cantităţi crescînde de ARN nemarcat ; 360 cmp = procentajul de hibridare.

Scanned with OKEN Scanner

copii de tip patern decît matern. Cu alte cuvinte, aceste gene în citoplasma de origine suferă o represie ; 2) gene care sînt funcţionale numai în stadii iniţiale şi nu sînt active cînd ajung într-o citoplasmă străină.

Această problemă fundamentală de influenţă a citoplasmei asupra genelor, care stă la baza diferenţierii embrionare, rămîne să fie rezolvată în viitor. Ceea ce se poate spune, este că ADN-ul are o specificitate biologică destul de mare.

12.6. ACTIVITATEA GENICĂ ÎN TIMPUL NEURULĂRII

Se manifestă printr-o sinteză atît a ADN-ului cît şi a ARN-ului. Este cunoscut de la H. Spemann că apariţia sistemului nervos central, care caracterizează neurulaţia, are loc prin inducţia plăcii precordale şi a plafonului mezoblastic faţă de ectoderm. Această morfogeneză se datoreşte difuziei unei substanţe inductoare care trece din plăcile precordale şi din plafonul mezoblastic în ectodermul „competent", determinînd diferenţierea sa în tub neural. Apoi, un alt factor provoacă diferenţierea ţesuturilor care derivă din mezoderm (notocord, muşchi şi tubuli renali), ca şi a celor derivate din endoderm (epiteliul intestinal).

În cursul dezvoltării normale endodermul şi mezodermul sînt localizate în jumătatea inferioară sau vegetativă a embrionului. Factorii care induc dezvoltarea primordiilor endodermice şi mezodermice sînt denumiţi de H. Tiedemann ca *vegetalizanţi*. Metoda implantării în blastocel, folosită de O. Mangold (fig. 162) a sondat întocmai acţiunea acestor factori asupra ectodermului. Factorul vegetalizant a fost izolat din trunchiuri de embrion de găină după 11 zile de incubaţie. Acestea au fost omogenizate în tampon fosfat cu dezoxicolat şi centrifugat la 19 000 g. Apoi omogenatul a fost precipitat cu sulfat de amoniu (0,40S), obţinîndu-se atît factorul vegetalizant (mezodermic), cît şi cel neurulizant. Ultimul poate fi precipitat cu sulfat de protamină, însă tratarea cu fenol extrage exclusiv factorul mezodermic, precipitat apoi cu metanol. După aceea omogenatul se purifică de proteinele inactive prin cromatografie pe carboximetilceluloză (6 M uree) şi, mai departe, prin electroforeză pe Sephadex G-100 (6 M uree). Ultima separare de proteinele acide se face prin focusare izoelectrică (*p*H = 3—10 şi *p*H = 7—9), obţinîndu-se la *p*H = 7,8 un vîrf de absorbţie maxim (280 nm). În diluţie de 1/20 000, împreună cu o proteină inertă (*Y*-globulină bovină) şi implantat în blastocelul unui anur sau urodel, factorul respectiv induce formarea în ectodermul gazdei de ţesuturi mezodermice şi endodermice : notocord, muşchi, nefroni şi epiteliu intestinal.

S-a experimentat şi „cooperarea" celor doi factori : *neurulizant* şi *mezodermizant*. Factorii respectivi au fost extraşi cu sulfat de protamină şi apoi precipitaţi cu pirofosfat. Proteinele şi ribonucleoproteinele dizolvate s-au separat prin cromatografiere pe DEAE-celuloză. Se obţin două

Scanned with OKEN Scanner

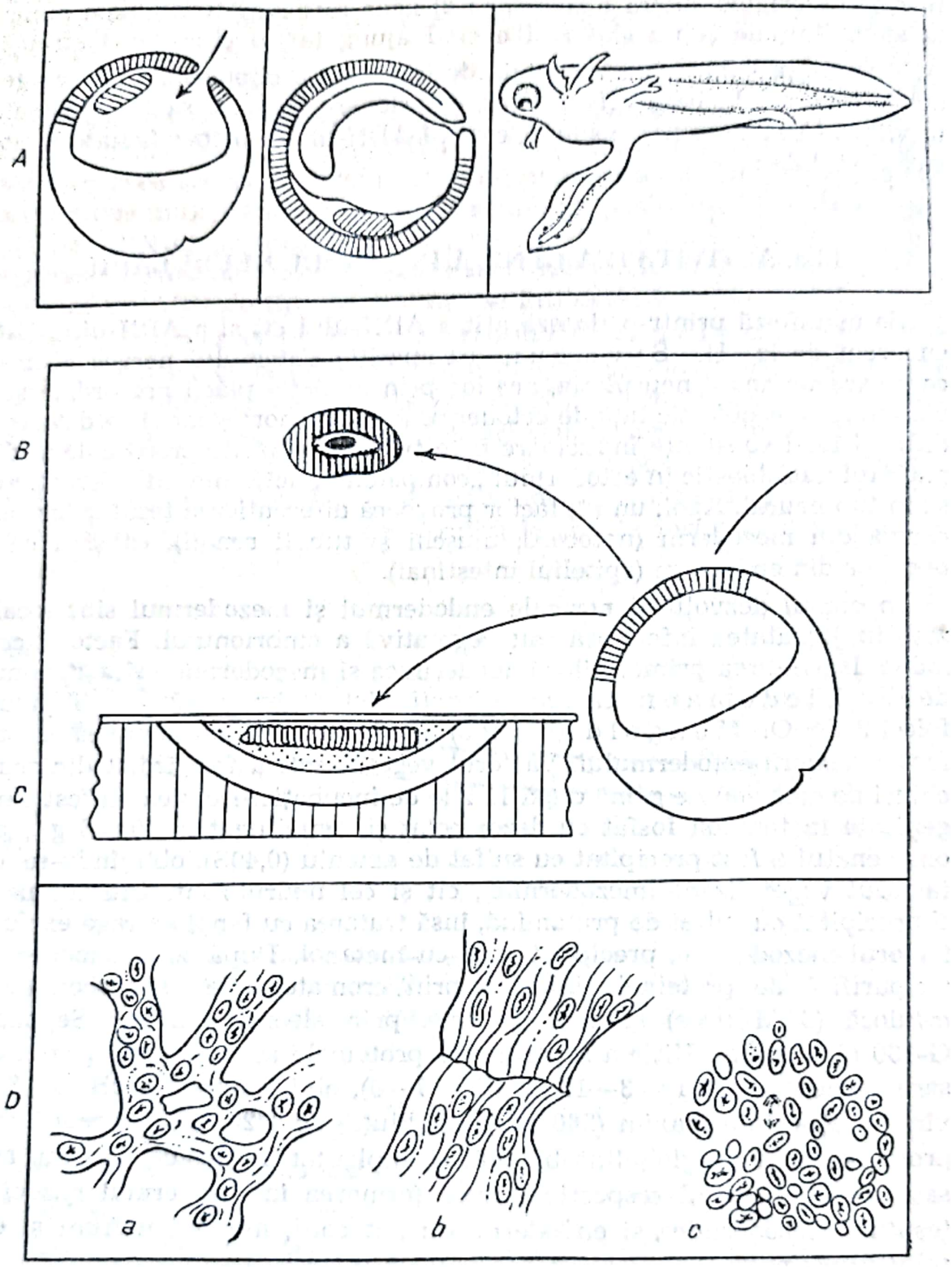


Fig. 162. Metodele folosite pentru studiul factorilor inductori :
A — implantarea în blastocel ; *B* — metoda „sandwich" ; *C* — tehnica explantării ; *D* — culturile obținute prin metoda explantării ;
a — fără nimic în cultură ; *b* — cu factor mezodermizant ; *c* — cu factor neurulizant.

Scanned with OKEN Scanner

fracţii : una care induce formarea unor structuri spinocaudo-mezodermice, care conţin deci şi factorul mezodermizant, şi alta ribonucleoproteinică, ce induce apariţia creierului anterior. Deci factorul neural este de natură ribonucleoproteică, iar cel mezodermizant de natură proteică.

Pe de altă parte, S. Toivonen şi L. Saxen (1955) au arătat că şi în ficatul de cobai se găseşte inductorul creierului anterior, iar în măduva osoasă cel mezodermic. Însă nici ficatul singur şi nici măduva osoasă nu pot induce formarea măduvei spinării. Numai implantaţi împreună în blastocel este posibilă formarea tubului neural al măduvei (fig. 163).

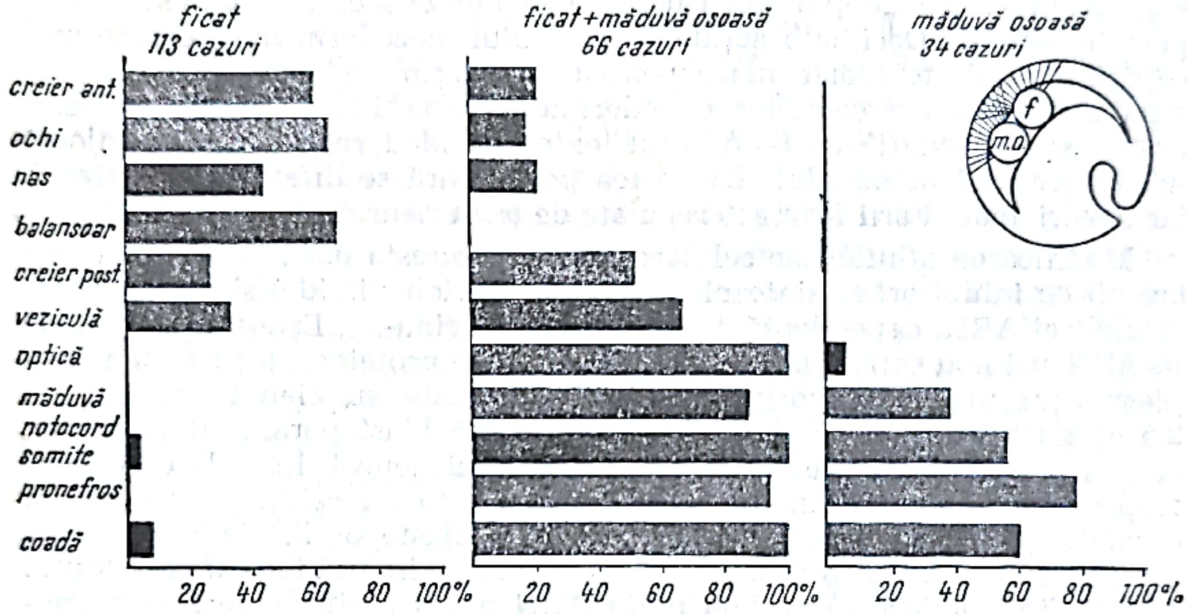


Fig. 163. Acţiunea inductoare a ficatului (*f*) şi a măduvei osoase de cobai (*m.o.*).

N. Tiedemann, amestecînd de asemenea cei doi factori purificaţi şi mărind cantitatea celui neuralizant, obţine din ce în ce mai multe inducţii ale creierului posterior în loc de formaţiuni trunchi-coadă. Deci formaţiunile encefalului, măduvei şi trunchiului se formează prin „cooperarea" acestor doi inductori : neural şi mezodermic. O parte din celulele ectodermale sînt transformate în celule *mezodermalizante* şi altă parte în celule *neuralizante*, numărul acestora depinzînd de proporţia dintre cei doi factori şi, poate, de gradul lor de difuzie. Inducţia creierului posterior se face mai întîi sub influenţa factorului neural ; de aceea se transformă în rombencefal sub influenţa inductoare a mezenhimului capului, indus la rîndul său de factorul mezodermizant. În embrioni există în acelaşi timp factori care inhibă proteinele şi ribonucleoproteinele inductoare.

H. Tiedemann (1968), congelînd şi dezgheţînd trunchiuri de embrioni de găină le omogenizează, apoi le centrifughează cu 2 vol. 0,1 M NaCl, la 105 000 g/2 ore, iar supernatantul îl precipită cu 2 vol. de etanol şi-l dizolvă în 0,1 M NaCl. După o separare a reziduurilor printr-o centrifugare la 116 000 g supernatantul este trecut prin hidroxiapatită (2×10^{-3}M tampon fosfat, la pH = 6,8). Prin electroforeză, la pH = 7,5,

inhibitorii migrează la anod, fiind niște proteine acide, iar în cazul folosirii metodei focusării izoelectrice punctul izoelectric se află la *p*H = = 2,5—3,0.

Este cunoscut din 1939, odată cu experiențele lui J. Holtfreter, că la embrionii de amfibieni apar „afinități" celulare diferențiale pentru prima dată odată cu gastrulația. Disociindu-se celulele calotelor ectodermice și endodermice de la amfibieni și amestecîndu-se după aceea, se vede cum celulele ectodermului se separă de acelea ale endodermului. În prezența factorului vegetalizant, cele două foițe se asociază. Dacă factorul mezodermizant purificat este implantat în blastocelul unei gastrule de triton, gastrulația, cu toate că se desfășoară, nu se formează însă placa neurală. După 18 ore, „dopul" lui Rusconi evaginează și endodermul se întinde peste ectoderm. Deci, sub acțiunea factorului mezodermizant, ectodermul capătă o afinitate foarte mare pentru endoderm, în comparație cu afinitatea reciprocă a celulelor endodermice. După 10—14 zile acești embrioni sînt formați dintr-un strat extern endodermic care înconjoară musculatura și notocordul. La partea posterioară se diferențiază nefroni, iar uneori apar și arii foarte neregulate de țesut neural.

Modificarea afinităților celulare nu se manifestă dacă se tratează embrionii cu inhibitori ai sintezei proteinelor (cicloheximida) și cu inhibitori ai sintezei ARN, dependentă de ADN (actinomicina-D). Este vorba, deci, de *m*-ARN-uri nou sintetizate și, în consecință, de proteine care trec din citoplasmă în nuclei provocînd diferențierea. Este suficientă tratarea cu 2,5 μg/ml a unui „sandwich" de buză dorsală blastoporală cu ectoderm, ca să se inhibe complet diferențierea țesutului neural. Însă, la o concentrație de 0,5 μg/ml timp de 2—10 ore, apar totuși celule musculare și cardiale. Aceasta dovedește că buza dorsală blastoporală (determinată să formeze musculatura și notocordul și capabilă să inducă formarea țesutului neural din ectoderm) are deja puțin ARN necesar diferențierii cordomezoblastice dar nu și pe acela al plăcii neurale, care trebuie sintetizat și este de un anumit fel. Spunem aceasta deoarece ectodermul sintetizează toate 3 felurile de ARN dar singur nu se poate autodiferenția în țesut normal. Probabil că este vorba de un *m*-ARN care, în ectoderm, este sintetizat într-o cantitate pe jumătate mai mică decît în neurulă.

12.7. DETERMINAREA — PRELUDIUL DIFERENȚIERII

Determinarea este preludiul diferențierii, adică un proces care inițiază căile specifice ale dezvoltării dintre multele posibilități pentru care sistemul celular este „competent". S-a dovedit că determinarea precede întotdeauna diferențierea. Primordiul determinant al unui organ se deosebește de alt primordiu printr-un caracter prospectiv, care-l angajează pe calea diferențierii în mod ireversibil.

Determinarea poate fi mai mult sau mai puțin completă, prezentînd chiar grade diferite ale acestei stări. Astfel, cînd ectodermul dorsal al gastrulei de amfibieni suferă inducția platformei arhenteronice (a mezodermului invaginat), ectodermul se transformă în placă neurală. Abia mai tîrziu această placă neurală va diferenția neuroblaști. Determinarea cordomezodermului, adică a inductorului, are loc, la rîndul său, într-un stadiu

Scanned with OKEN Scanner

foarte timpuriu în momentul fecundației, cînd se formează „secera cenușie", dar nu-și exercită funcțiile de inductor decît în momentul începerii gastrulației, cînd se găsește în buza dorsală superioară.

În privința țesutului „competent" care suferă inducția, și acesta are o stare de determinare, deoarece el nu poate răspunde la acțiunea inductoare decît într-un anumit stadiu de dezvoltare și într-o anumită poziție pe care o ocupă în embrion. Ectodermul nu reacționează înaintea gastrulației, iar după gastrulație își pierde „competența" în cîteva ore. Această competență este ea însăși un rezultat al inducției. De pildă, ganglionii cerebroizi ai planariilor exercită o acțiune inductoare asupra marginilor corpului din regiunea anterioară a turbelariatului care diferențiază ochii, marginile posterioare ale corpului fiind „necompetente". Această pierdere a capacității inductoare se datorește unor proteine întrucît, dacă se inhibă sinteza lor prin cicloheximidă, embrionul amfibienilor este „competent" și după terminarea gastrulației. Sînt situații în care starea de determinare poate fi caracterizată biochimic. Este cazul glandelor genitale unde enzimele care sintetizează hormonul sexual apar înaintea diferențierii gonadei.

E. H a d o r n și școala sa au studiat fenomenul determinării pe discurile imaginale de la *Drosophila*. După cum se știe, discurile imaginale ale insectelor parcurg stadiul larvar fără să se dezvolte și abia în timpul metamorfozei se constituie diferitele organe ale insectei. Precizăm că stadiile larvare sînt reglate de acțiunea hormonului năpîrlirii (ecdizon secretat de glanda protoracică) și de hormonul juvenil (secretat de „corpora alata") care inhibă metamorfoza. Cînd se secretă amîndoi hormonii, cel juvenil inhibă metamorfoza și ecdizonul provoacă numai năpîrlirile. În ultimul stadiu larvar, hormonul juvenil nu se mai secretă iar ecdizonul acționează ca hormon al metamorfozei. După metamorfoză, „corpora alata" începe să sintetizeze din nou hormon juvenil, care favorizează creșterea și fiziologia organelor genitale. Bazîndu-se pe această particularitate fiziologică, H a d o r n implantează discuri imaginale în organismul adult împiedicînd, astfel, transformările (metamorfozele) în organul respectiv. În special s-au transplantat de la larvă la adult discurile imaginale ale aparatului copulator, antenelor și aripilor. În această situație, celulele se înmulțesc activ, volumul discului crește și totul rămîne nediferențiat.

Experiențe au mai fost făcute și în sensul unei transplantări succesive a fragmentelor de disc la generații de adulți, realizîndu-se o adevărată cultură „in vitro" de lungă durată. Fiecare explant imaginal este împărțit în două la fiecare transfer și o jumătate este grefată într-o larvă, iar cealaltă jumătate în adult. Jumătatea grefată în larvă se dezvoltă, în timp ce jumătatea grefată în adult rămîne în starea determinantă prelungită. Astfel s-au transplantat timp de 2 ani, în 55 de transferuri succesive, discuri imaginale genitale (fig. 164). În general, diferențierea în larvă este conformă cu natura discului care dă naștere la diferitele piese ale armăturii genitale. Cu alte cuvinte, diferențierea pe care o constatăm în mod normal este conformă cu valoarea prospectivă a primordiului. Starea „autotipică" de determinare a primordiului se menține timp de generații. Dar s-a mai constatat că, după o serie de transplantări succesive, transferul

Scanned with OKEN Scanner

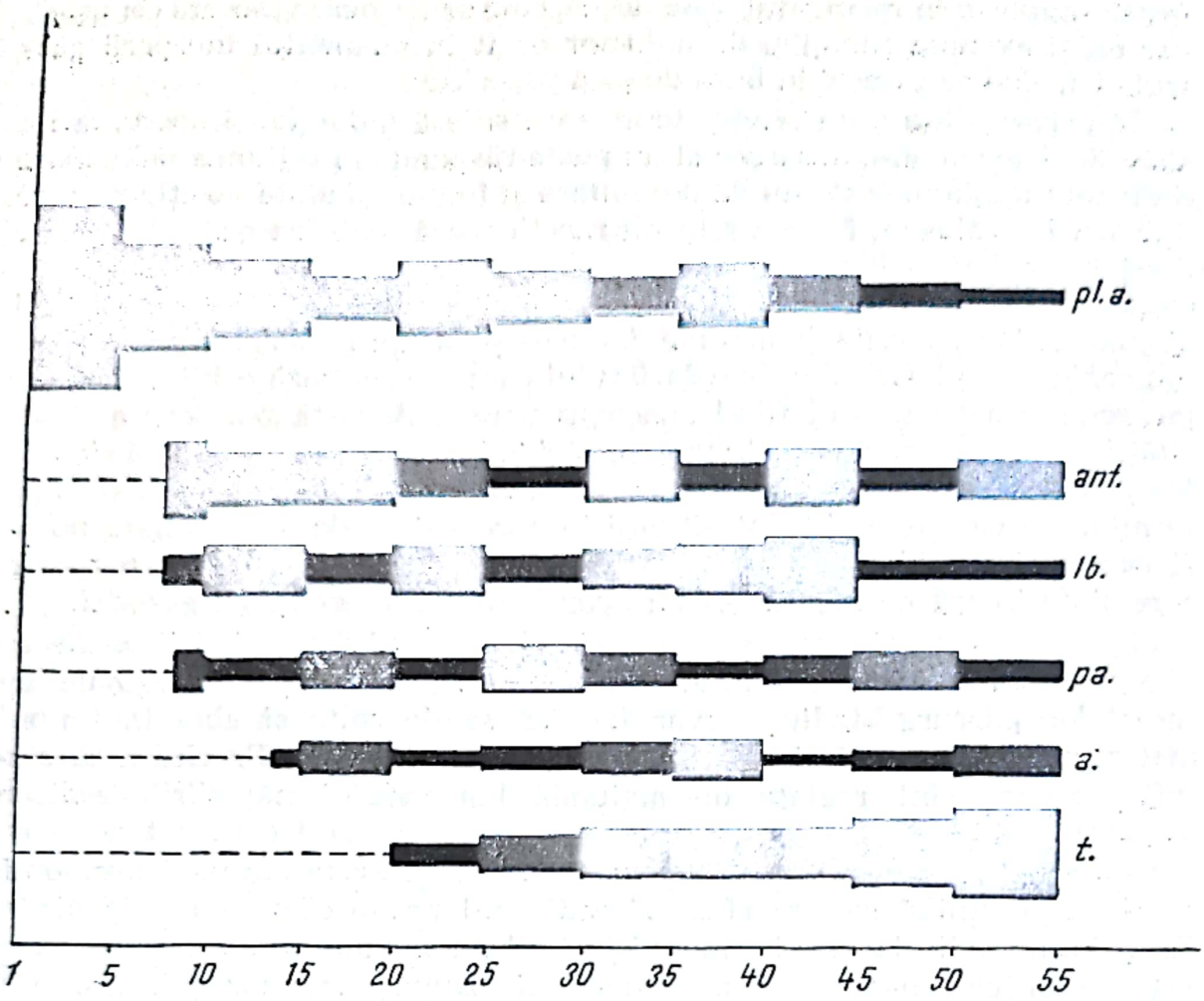


Fig. 164. Cronologia şi frecvenţa relativă a diferenţierii plăcilor anale (*pl.a.*), antenelor (*ant.*), labelor (*lb.*), palpilor (*pa.*), aripilor (*a.*) şi toracelui (*t.*) din 519 implantări derivate dintr-un singur disc genital mascul. S-au studiat exemplarele din prima şi pînă la a 55-a generaţie (după E. Hadorn).

discurilor imaginale genitale în larvă nu mai răspunde printr-o diferenţiere normală ci „allotipică". Într-adevăr, din asemenea discuri imaginale genitale apar după a 7-a generaţie antene, palpi, la a 13-a generaţie aripi şi după a 12-a generaţie torace.

Acest fenomen a fost denumit *transdeterminare* şi este datorat unei modificări în activitatea unor gene care, în mod normal, sînt represate.

Posibilităţile de transdeterminare sînt direcţionate în sensul că celulele cu determinism de celule genitale, după o primă transdeterminare, duc la apariţia capului sau a picioarelor şi la a doua, la apariţia aripilor. Niciodată o transdeterminare nu se face direct de la celulele care vor da naştere organelor genitale la cele din care vor apărea aripile. Este bine precizat că, cu cît are loc o proliferare mai rapidă a transplantelor, cu atît este mai mare posibilitatea noilor represii şi derepresii, care duc la transdeterminare.

12.8. INTERACȚIUNILE TISULARE ÎN CURSUL ORGANOGENEZEI

Reprezintă un aspect al inducției prin care se realizează diferențierea diverselor organe. Școala lui E. T. Wolff a demonstrat că există *inductori specifici* ai organelor. Se pot distinge 3 categorii de organe, după modul lor de formare :

— *organe ce se formează prin diferențiere autonomă,* în care intră acelea care se formează fără o acțiune aparentă a primordiilor învecinate. Ele apar devreme în dezvoltarea embrionară, cînd unul sau mai multe teritorii capătă spontan determinarea lor, iar mai tîrziu se diferențiază morfologic, cum este cazul inimii ;

— *organe care se formează sub acțiunea unui inductor principal,* cum este cazul craniului și vertebrelor care se formează sub acțiunea axului cerebrospinal ;

— *organele complexe care se formează sub acțiunea a doi inductori succesivi sau simultani,* cum este ochiul și ficatul, a căror geneză se datorește acțiunii reciproce a două sau mai multe primordii.

La aceste acțiuni inductoare se adaugă mai tîrziu și altele, care modelează structura organului.

Wolff împarte substanțele inductoare în 2 categorii : unele cu specificitate strictă numite inductori *„instructivi"*, adică aceia care transmit informația de care depinde natura organului (aceștia sînt, de fapt, inductorii primari) ; alți inductori sînt denumiți *„permisivi"*, deoarece permit diferențierea fără să prezinte o specificitate prea mare. Inductorii permisivi sînt secundari.

Formarea inimii la vertebrate. H. Lütz a arătat că blastodermul oului de pasăre este capabil să se dezvolte în doi embrioni dacă este separat în două pe dedesubtul său. Deci blastomerele discoblastulei păsării sînt *totipotente,* putînd forma diferite țesuturi.

În cursul dezvoltării embrionare, diferitele potențialități organoformatoare ale blastomerelor se restrîng în cadrul unor teritorii bine definite ale embrionului. Astfel, capacitatea de a forma țesuti cardiac o au la început toate blastomerele discoblastulei dar, odată cu apariția prelungirii cefalice (22 zile de incubație), capacitatea se restrînge la două arii laterale de o parte și de alta a nodulului lui Hansen, iar primele contracții apar între 33—38 ore cînd embrionul are 10 somite.

J. Ebert, cu ajutorul metodelor imunochimice, a stabilit că miozina cardiacă la 12—20 ore de incubație este distribuită în tot blastodermul. La 22 ore ea se restrînge la ariile prezumtive ale inimii, în afară de cîteva urme în zona mediană. La 25 ore ea este localizată în ariile prezumtive ale inimii. Abia acum aceste arii, cînd sînt transplantate pe membrana corioalantoidiană, devin capabile să se diferențieze în țesut cardiac contractil, deci miozina apare mult mai devreme decît se diferențiază inima. Studiul repartiției actinei arată că și în cazul miozinei poate fi pusă în evidență pentru prima oară la 18 ore de incubație, iar la 24 ore, cînd apare prelungirea cefalică, numai primordiile prezumtive ale inimii conțin actină (fig. 165).

Spre deosebire de miozină însă, actina cardiacă purificată nu este omogenă conținînd 3 componente antigenice dintre care una este identică

Scanned with OKEN Scanner

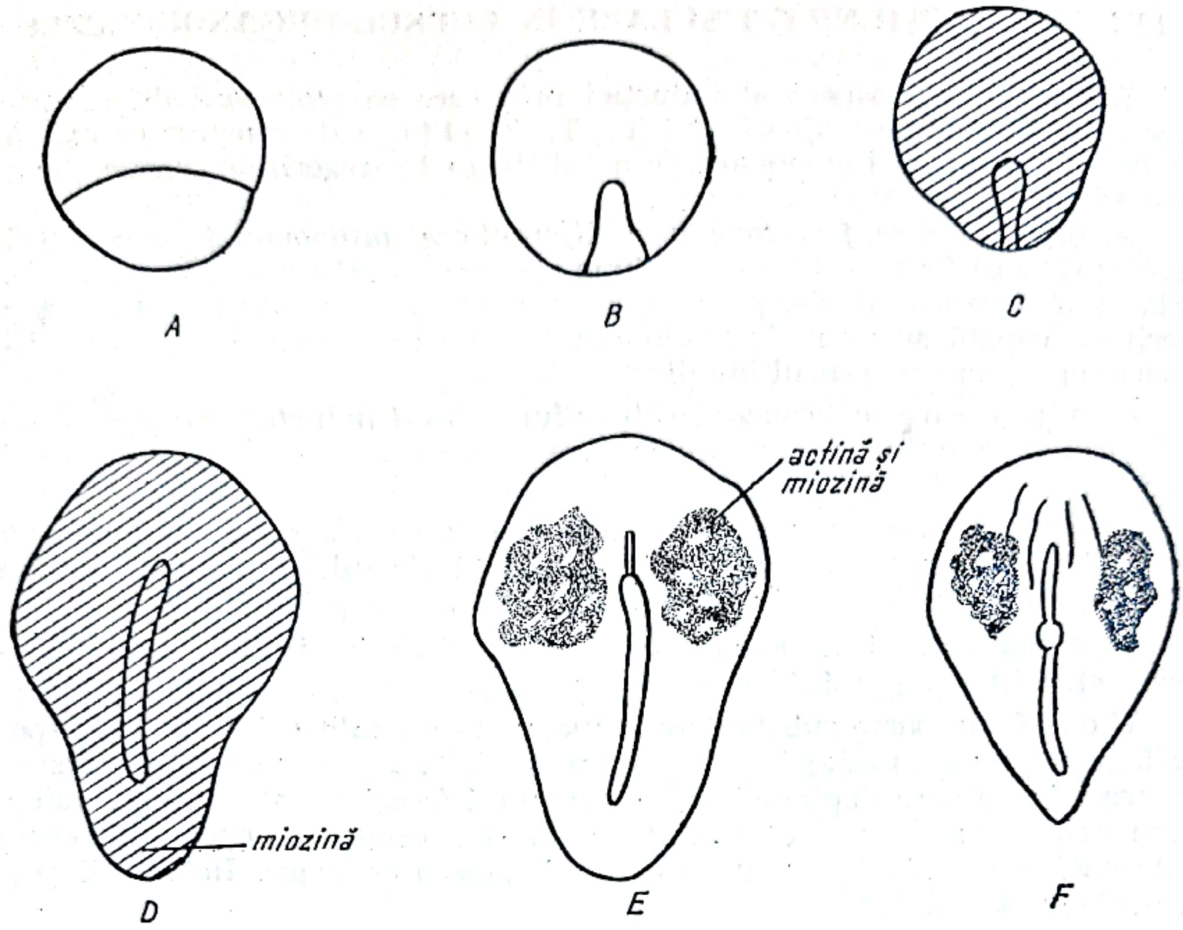


Fig. 165. A-F — diferite stadii privind distribuția actinei și miozinei în embrionul de găină (după J. Ebert).

cu actina scheletică. Dintre celelalte componente specifice inimii, una apare mai repede iar cealaltă mai tîrziu, după 12 ore de incubație.

Metodele de electrofiziologie folosite de G. Obrechi-Coutris au permis identificarea naturii diferitelor tipuri de celule cardiace datorită activității electrice caracteristice lor. Astfel, în ariile prezumtive cardiace, s-au stabilit existența a 3 populații de celule : *sinoatriale*, *ventriculare* și *bulbare* așezate la niveluri diferite. În stadiile precoce, automatismul contractil nu este specific anumitor celule, întrucît toate mioblastele cardiace prezintă această proprietate. Atunci cînd apare automatismul, celulele ventriculare dețin comanda primordiului cardiac și abia mai tîrziu celulele sinoatriale se diferențiază și sînt responsabile de acest automatism.

Evoluția automatismului cardiac este însoțită de modificări ale permeabilității membranelor deoarece membrana celulelor miocardice nu are de la început decît o permeabilitate pentru calciu și sodiu cu cinetică mică și de-abia cu timpul apare o conductanță sodică rapidă și o permeabilitate potasică întîrziată. De asemenea, sensibilitatea la mediatorii chimici crește în cursul dezvoltării, însă de la început miocardul prezintă receptori pentru catecolamine și receptori acceleratori și inhibitori pentru acetilcolină care reglează automatismul inițial. Miocardul embrionar este

Scanned with OKEN Scanner

însă puţin sensibil la inhibitorii metabolici deoarece există căi metabolice mai adaptate pentru condiţiile anaerobe în cursul dezvoltării embrionare incipiente.

Organele care se formează sub acţiunea unui inductor special. Experienţele lui J. Benoit şi J. Schowing efectuate pe embrioni de găină au stabilit că sistemul nervos elaborează substanţe inductoare care determină apariţia şi dezvoltarea oaselor neurocraniului. Dacă se înlocuieşte encefalul embrionar printr-un fragment de tub neural, craniul nu mai are boltă, embrionii nu au faţă, cu toate că au ochii bine individualizaţi şi nu apar decît oasele supraoccipitale şi scvamozale. Chiar şi planşeul cranian este modificat profund. Acest fapt se datoreşte unui *inductor osteogen* specific care se găseşte în ţesutul nervos encefalic şi nu în măduva spinării. Experienţe făcute prin inversia encefalului sau substituirea prozencefalului cu rombencefalul dovedesc pe de altă parte existenţa mai multor inductori la nivelul veziculelor cerebrale primitive. Într-adevăr, rombencefalul nu poate induce formarea oaselor frontale care nu se dezvoltă decît în vecinătatea imediată a mezencefalului. Tot astfel, parietalele nu se diferenţiază decît dacă mezencefalul se găseşte în apropierea lor ; fără mezencefal nu se formează, iar prozencefalul nu poate induce formarea lor (fig. 166).

Fiecare inductor cefalic acţionează specific asupra mai multor primordii osoase determinate. Astfel, frontalul este indus de prozencefal şi mezencefal, occipitalul de rombencefal, de coarda dorsală şi tubul neural ; numai bazisfenoidul este indus de coarda dorsală. Cum se poate observa în cazul occipitalului, inductorul nu este strict localizat deoarece neapariţia occipitalului necesită o ablaţie imensă care cuprinde romben-

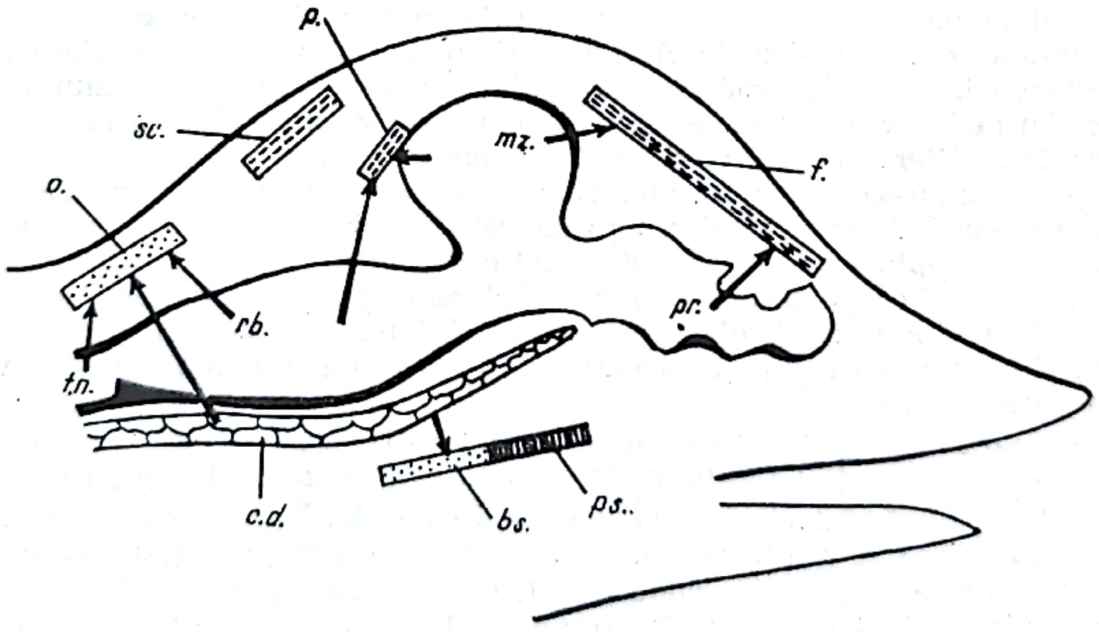


Fig. 166. Schema generală a diferitelor acţiuni inductoare ale encefalului şi coardei dorsale asupra oaselor neurocraniului :

f. — frontal ; *p.* — parietal ; *o.* — occipital ; *ps.* şi *bs.* — parasfenoid şi bazisfenoid ; *sc.* — scvamozal ; *pr.* — prozencefal ; *mz.* — mezencefal ; *rb* — rombencefal ; *t.n.* — trunchi neural ; *cd.* — coardă dorsală (după J. Benoit).

Scanned with OKEN Scanner

cefalul, tubul neural și coarda dorsală. În acest timp, encefalul este închis de cutia craniană care delimitează extensia sa fără să-i împiedice creșterea, fapt care se traduce prin dezvoltarea în sens posterior a emisferelor cerebrale.

În privința condrogenezei vertebrale, se admite acum că celulele sclerotomice care se desprind din mezenhimul somitelor sînt determinate genetic în sensul diferențierii în celule cartilaginoase, înainte de a migra în spațiul acelular periaxial unde ale se înglobează într-un material extracelular secretat de tubul neural și de coarda dorsală. Este știut că materialul extracelular periaxial se înglobează în matricea cartilajului în cursul diferențierii vertebratelor.

G. Strudel (1973) a arătat că acest material periaxial este direct implicat în mecanismul condrogenezei vertebrale, integritatea lui condiționînd diferențierea fenotipică a condrocitelor vertebrale. Experiențele de cultură „in vitro" a primordiilor de vertebre de 2—3 zile au arătat că dacă materialul periaxial este hidrolizat cu enzime, condrogeneza vertebrală este inhibată. În materialul extracelular, H. Slavkin a observat vezicule cu ARN și că, probabil, adausul de acizi nucleici poate să suplinească lipsa materialului extracelular și să declanșeze condrogeneza.

Organe complexe care se formează sub acțiunea mai multor inductori. Asemenea cazuri se găsesc în cursul dezvoltării embrionare a ficatului. Acest organ se constituie la începutul ontogenezei prin evaginarea endodermului de la nivelul buzei anterioare a ombilicului intestinal, atunci cînd embrionul are circa 20 somite. Se formează un mugur endodermic care se înglobează într-o masă de celule libere mezenhimale care înfășoară sinusul venos, alcătuind astfel un sept transversal (fig. 167, *A*).

Nicole Le Douarin (1969) a putut demonstra experimental că ficatul ia naștere, de fapt, dintr-un primordiu mai complex și anume dintr-unul endomezodermic. Astfel, în timp ce din endoderm proliferează cordoane hepatice, mezodermul înconjurător este sub forma unui mezenhim nediferențiat (celule libere într-o masă amorfă). Teritoriul endodermic proliferează deci cordoane de celule care invadează mezenhimul, transformîndu-se în hepatocite. Dar se poate opri această invazie de cordoane endodermice plasînd un obstacol (membrană cochilieră de ou, de găină) în dreptul somitelor 3—6, astfel că proliferarea cordoanelor endodermice în direcția posterioară a embrionului nu mai are loc. Și cum este de așteptat, după plasarea obstacolului nu se mai formează țesut hepatic. Deci, mezenhimul hepatic omolog singur nu poate forma un țesut hepatic (fig. 167, *B*).

Într-o altă experiență se scoate, numai de pe o latură a embrionului, un lambou din aria laterală din dreptul somitelor 3—6. Astfel se împiedică formarea hepatocitelor înapoia zonei excizate. În rest, adică pe cealaltă latură ca și deasupra zonei excizate, se diferențiază țesut hepatic. Dacă acum se grefează un endoderm hepatic în zona posterioară exciziei, el se diferențiază în hepatocite (fig. 168) Deci, mezenhimul omolog asigură supraviețuirea endodermului hepatic și diferențierea lui în hepatocite. Numai mezodermul hepatic permite diferențierea endodermului hepatic; dar și alte mezenhimuri heterologe (splanchnopleura și somatopleura) pot avea aceleași acțiuni inductoare. Dacă în embrionul

Scanned with OKEN Scanner

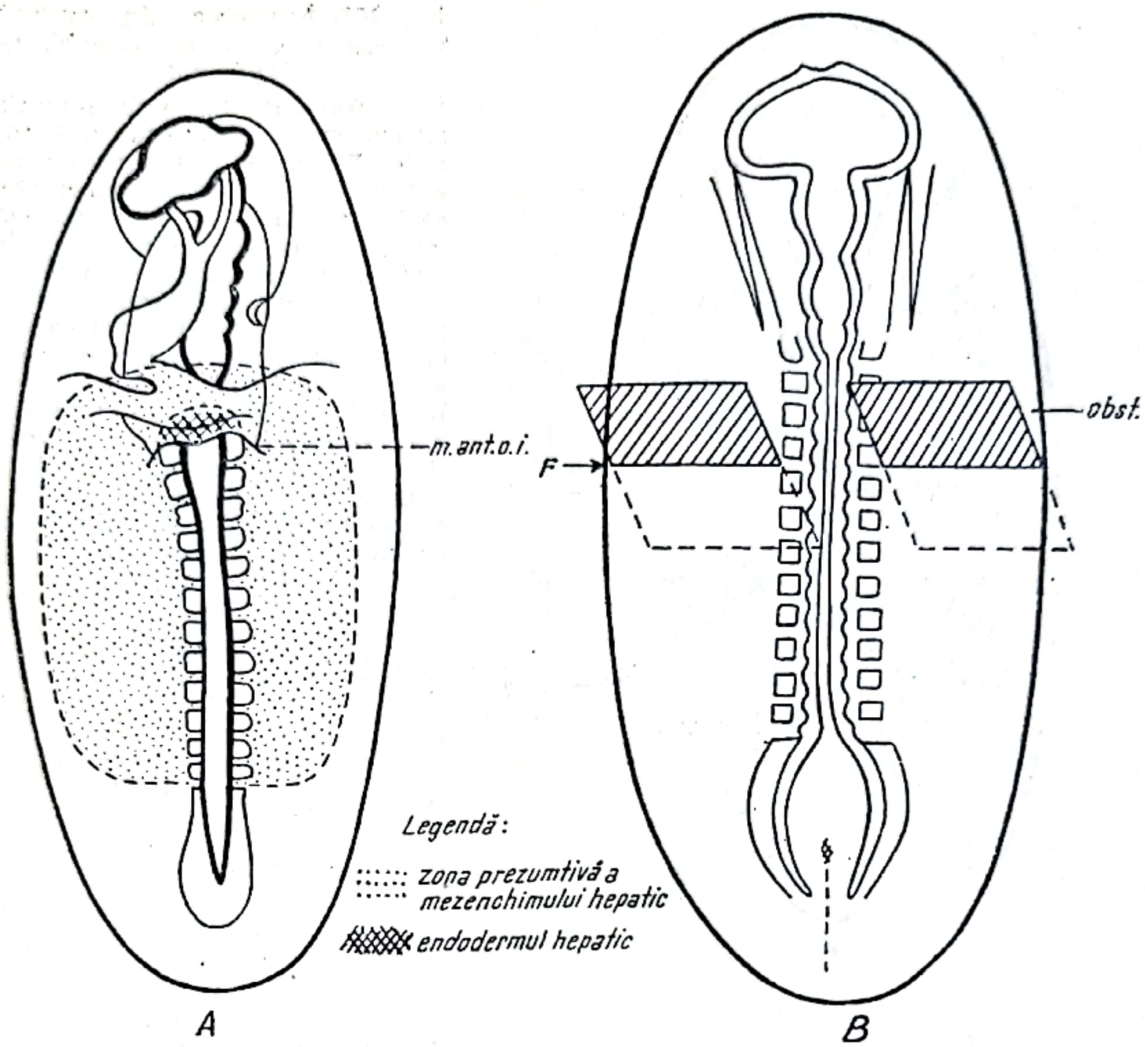


Fig. 167. A — localizarea zonelor prezumtive endodermice şi mezodermice ale ficatului la un embrion de 15 somite :

m.ant.o.i. — marginea anterioară a ombilicului intestinal ;

B — intervenţie experimentală permiţînd să se izoleze partea posterioară a zonei prezumtive a ficatului, ceea ce împiedică colonizarea mezenhimului hepatic prin cordoanele de hepatocite de origine endodermică. Obstacolele *(obst.)*, constituite printr-un fragment rectangular de membrane cochiliere, sînt inserate într-o fantă (*F*) transversală afectînd cele trei foiţe embrionare.

operat se grefează în partea posterioară a exciziei un endoderm luat de la un embrion foarte tînăr — în stadiul cu prelungire cefalică — acesta nu mai răspunde printr-o diferenţiere hepatică. Endodermul este prea tînăr, neatingînd stadiul determinat (fig. 169). Dacă, din contră, asemenea endoderm „tînăr" este grefat împreună cu mezodermul subiacent propriu acelui stadiu, în zona posterioară exciziei are loc o diferenţiere celulară a hepatocitelor (fig. 170). Deci tocmai în acele stadii tinere de 5 somite are loc „determinarea" endodermului hepatic care-l face „competent" să fie indus de acţiunea unor anumite mezenhimuri. Or, starea determinării este dată, după cum se vede, de acţiunea mezodermului tînăr.

Scanned with OKEN Scanner

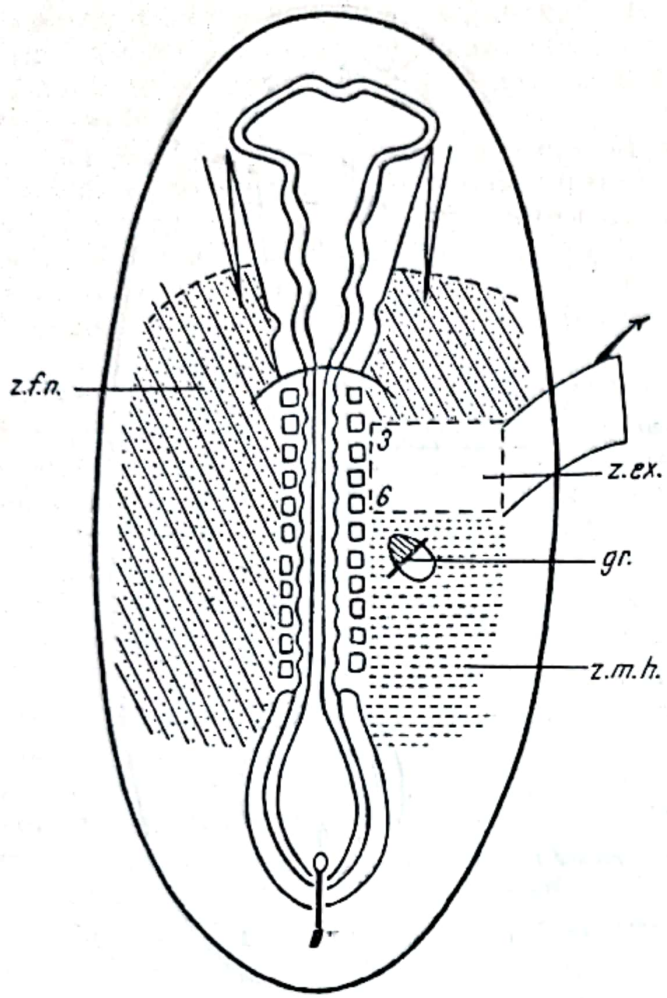


Fig. 168. Asocierea „in ovo" a endodermului şi a mezenhimului hepatic.

Un fragment din aria laterală se excizează în dreptul a 4 somite. Regiunea ariei prezumtive a ficatului dinapoia suprafeţei extirpate nu se mai colonizează cu cordoane endodermice ale gazdei. În această regiune se formează numai mezenhim hepatic (*z.m.h.*). Ficatul normal se organizează însă de partea opusă exciziei şi în partea dinaintea celei extirpate. Se grefează apoi muguri endodermici hepatici în zona numai cu mezenhim hepatic şi se obţin hepatocite : *gr.* — grefon ; *z.ex.* — zonă excizată ; *z.f.n.* — zonă de ficat normal în neoformare.

Evoluţia hepatică se produce deci în două etape : mai întîi are loc o determinare precoce de către mezoderm a endodermului faringian ventral, iar apoi o inducţie a diferenţierii endodermului determinat, realizată de mezenhimul hepatic. Însă endodermul determinat acţionează şi el printr-o inducţie asupra mezenhimului, evoluţia acestuia depinzînd de prezenţa endodermului.

Numeroasele experienţe de izolare a componentei mezenhimale din diferitele organe mezodermice (ficat, pancreas, stomac, glande salivare etc.) în cursul diferenţierii lor arată că, în lipsa epiteliului, mezenhimul degenerează şi moare. În consecinţă, odată mezenhimul intrat în contact cu endodermul, capătă proprietatea de a elabora substanţe inductoare pentru diferenţierea endodermului determinat. Pe de altă parte, există o acţiune reciprocă între endodermul care se diferenţiază şi mezenhimul respectiv, în urma căreia se realizează diferenţierea citologică.

În concluzie, în cursul embriogenezei apare o determinare precoce urmată mai tîrziu de o determinarea a endodermului, procese care funcţionează sub influenţa inductoare a mezodermului. Dealtfel, în stadiile timpurii ale dezvoltării planşeului faringian embrionar, există populaţii de celule care sînt determinate în sensul unui organ preombilical (stomac, intestin, pancreas, ficat). În cursul organogenezei există o interde-

Scanned with OKEN Scanner

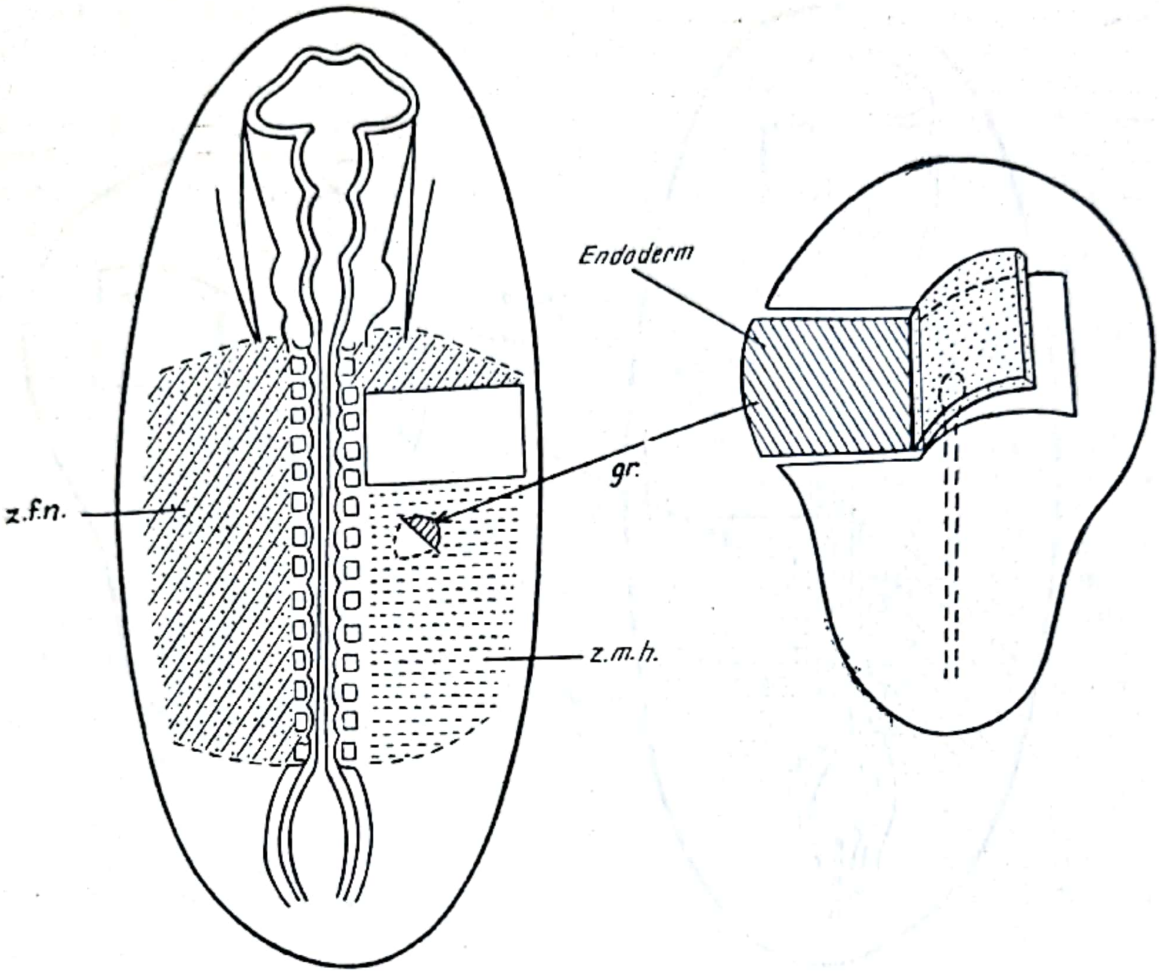


Fig. 169. Asocierea „in ovo" a endodermului ariei hepatice prezumtive a unui embrion în stadiu tînăr (cu prelungire cefalică) cu mezenhimul hepatic al unui embrion mai avansat.

Endodermul nu se diferenţiază în hepatocite, cu toată acţiunea inductoare a mezenhimului, pentru că este „incompetent" sau nu este încă determinat : *z.f.n.* — zonă de ficat normal ; *gr.* — grefon ; *z.m.l.* — zonă de mezenhim hepatic.

pendenţă bazată pe inducţii reciproce între endoderm şi mezoderm, astfel că endodermul determinat este capabil să inducă într-un mezenhim heterolog (somatopleură) formarea unor trame conjunctive specifice şi tunici conjunctivo-vasculare pentru fiecare organ preombilical. Modelarea organului se face în fiecare primordiu al său prin acţiunile morfogenice reciproce între endodermul şi mezenhimul respective.

Potenţialităţile diferenţierii endodermului determinat se exprimă diferit după mezodermul inductor. Mezodermurile axiale (cefalice şi somatice) de la embrionii de 5 zile incubaţie sînt nefavorabile evoluţiei endodermului, în timp ce mezodermurile lamelare laterale dau posibilitate tuturor potenţialităţilor endodermice. Cu trecerea vîrstei, mezenhimul splanchnic limitează capacitatea de diferenţiere a endodermului faringian pluripotent. Analize detaliate arată că se poate disocia diferenţierea morfologică de cea funcţională. Dacă mezenhimul hepatic al embrionului de 15 somite induce hepatocite pe seama buzei anterioare a intestinului ombilical, iar mai tîrziu acestea se încarcă cu glicogen, endodermul hepa-

Scanned with OKEN Scanner

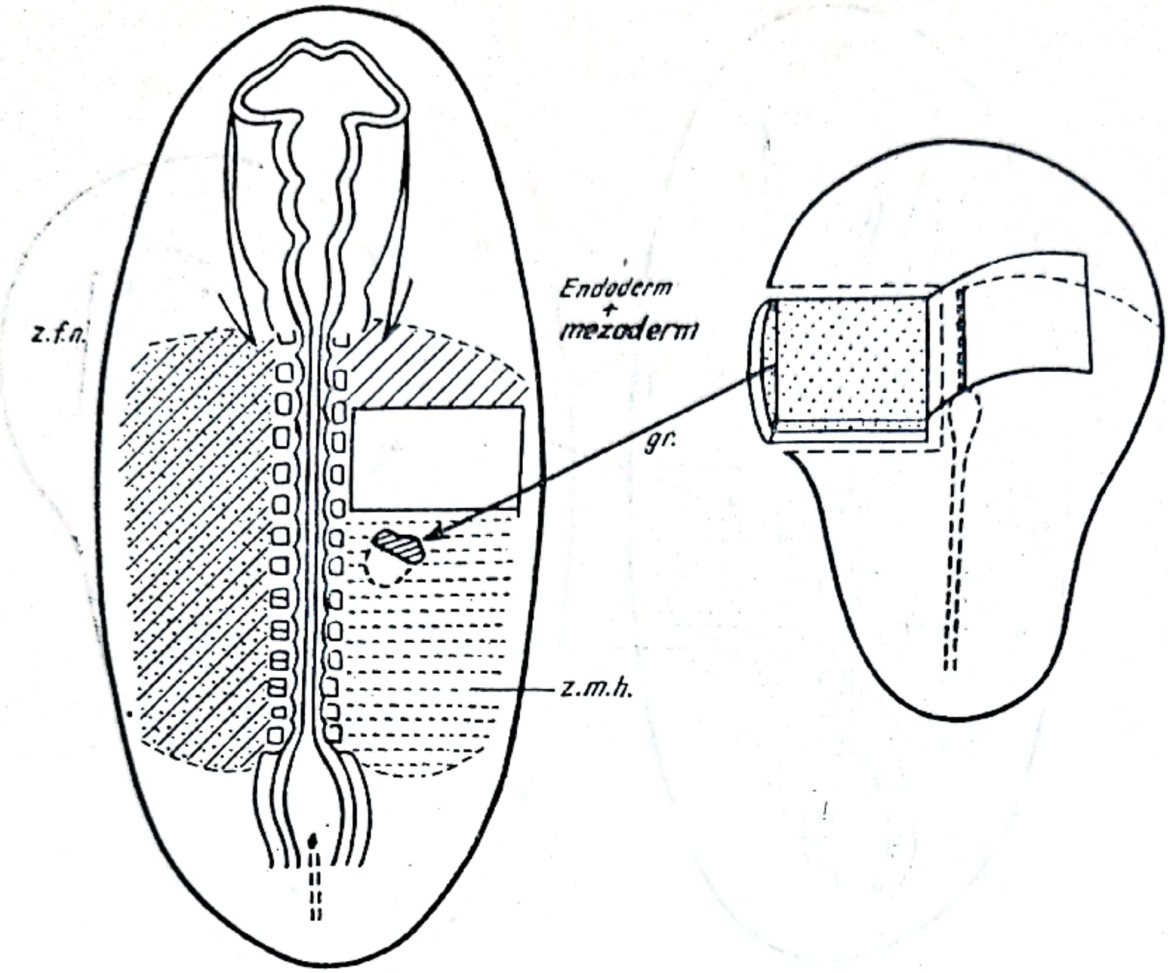


Fig. 170. Asocierea „in ovo" a endomezodermului ariei cardiohepatice cu mezenhimul propriu al ficatului-gazdă permite endodermului să devină „determinat" şi să se diferenţieze apoi în hepatocite sub acţiunea inductoare a mezenhimului hepatic al gazdei :
z.f.n. — zonă unde se formează ficatul normal ; *gr.* — grefa endodermului hepatic ; *z.ex.* — zonă excizată.

tic determinat, asociat cu mezenhim al metanefrosului, proliferează şi formează hepatocite, dar acestea nu sintetizează glicogen. Glicogeneza este însă restabilită prin adausul de mezenhim hepatic. Şi invers, hepatocite cu glicogen în contact cu mezenhim metanefrogen se divid, îl colonizează, dar pierd capacitatea de a sintetiza glicogenul.

Un alt exemplu interesant îl oferă formarea aripilor la păsări. În a 3-a zi de incubaţie, în dreptul somitelor 15—20, apare o îngroşare a mezodermului somatopleural, iar cîteva ore după aceea mugurul aripioarei devine proeminent şi este acoperit de un strat ectodermic. Ectodermul provoacă, oricare ar fi originea topografică, o diferenţiere a mezodermului subiacent în cartilaj. Această acţiune inductoare se realizează numai la contactul celulelor ectodermice şi mezodermice. Dar acţiunea ectodermului diferenţiază cartilaj numai în mezodermul aripii ; acesta „decide" calitatea diferenţierii induse, pentru că el însuşi este determinat în prealabil în sensul condrogenezei. Acest tip de inducţie este *permitivă*

Scanned with OKEN Scanner

(W o l f f). Pe de altă parte, ectodermul stimulează și diferențierea cartilajului în mezodermul care a suferit deja influența permitivă a lui, mezoderm care este capabil de diferențiere condrogenă autonomă. Această inducție este *trofică*, ea putînd fi realizată de diferite țesuturi printr-un factor difuzibil prin membrane viteline ce stimulează condrogeneza. În acest caz, M. G u m p e-P i n o t (1973) susține că efectele ectodermului sînt *inductoare* și *stimulatoare*, avînd de-a face cu o dualitate a inducției. Mai mult decît atît, ectodermul dorsal de șoarece diferențiază cartilaj în mezodermul aripii de găină întocmai ca și ectodermul de la pui. În schimb tubul nervos de șoarece, ca și cel de găină, nu poate induce „in vitro" cartilaj în mezodermul aripii de găină.

Interacțiunile dintre ureterul embrionilor de găină (15 zile de incubație) cu diferite mezenhimuri ale organelor embrionare au fost studiate prin metoda transplantării ureterului cu respectivul mezenhim, pe membrana corio-alantoidiană. În acest fel s-a observat că ureterul poate diferenția în tubuli uriniferi și glomeruli renali atît mezenhimului mezonefrogen cît și mezenhimurilor gastrice, pulmonare și intestinale. Dar și mezenhimurile transformă la rîndul lor ureterele. Astfel, mezenhimul intestinal induce în uretră structuri intenstinale cu pliuri și glande, mezenhimul gastric transformă ureterul într-un veritabil stomac, iar mezenhimul pulmonar produce în ureter o pluristratificare de tip pulmonar. Este destul de evident că au loc acțiuni reciproce între primordiile embrionare.

Inductorii puternici ai primordiilor organelor embrionare sînt capabili să producă diferențieri conforme cu natura inductorului, în schimb inductorii slabi produc diferențieri conforme cu natura primordiului care a suferit inducția (fig. 171).

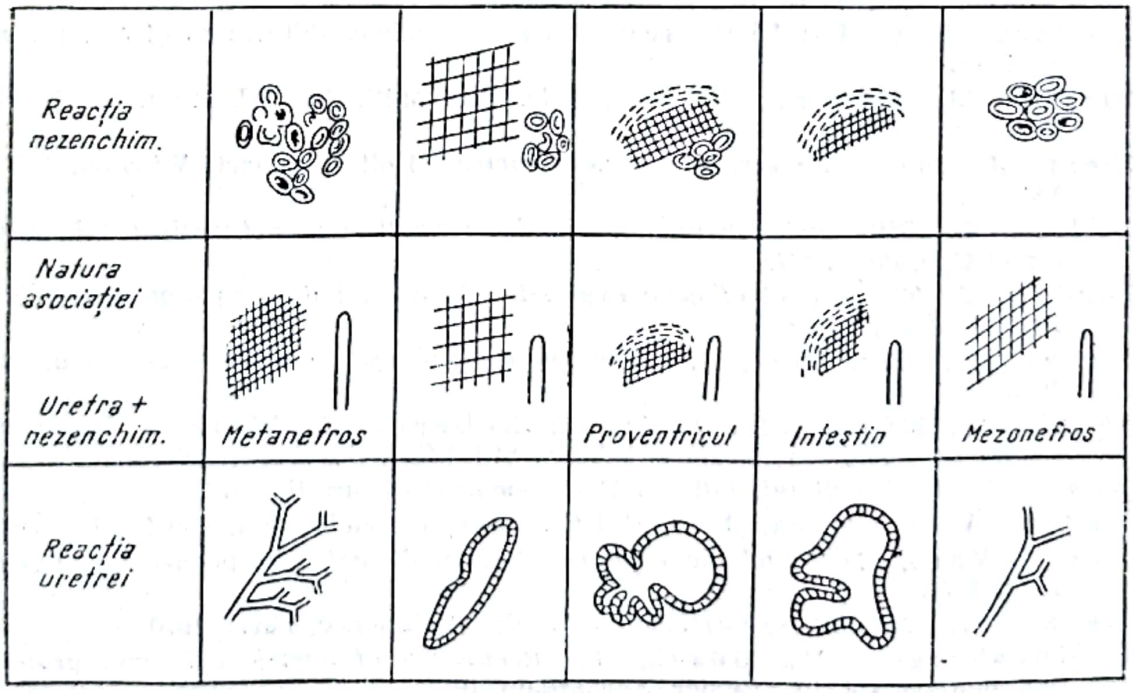


Fig. 171. Schemă recapitulînd rezultatele combinațiilor între uretră și diferite mezenhimuri.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Baker, J. *The cell theory : a restatement, history and critique.* „Journ. of micr. sc.", *Part. I* 89—1948, *p.* 103—125 ; *Part. II* 90—1949, *p.* 87—108 ; *Part. II* 90—1949, *p.* 331 (ad dendum) ; *Part. III* 93—1952, *p.* 157—190 ; *Part. IV* 94—1953, *p.* 407—440 ; *Part. V* 96—1955, *p.* 449—481.

Beermann, W. *Developmental Studies on Giant Chromosomes.* Springer, Berlin, 1972.

Berkaloff, A. J., Bourgnet, Favard, P., Guinnehault, M. *Biologie et Physiologie cellulaire.* Coll. Méthodes. Ed. Hermann, Paris, 1967.

Botnariuc, N. *Biologie generală.* Editura didactică și pedagogică, București, 1974.

Brachet, J. *Biochemical cytology.* Acad. Press, N.Y., 1957.

Brachet, J., Mirsky, A. *The cell.* Acad. Press, N.Y. vol. I—IV, 1959—1962.

Brachet, J. *Introduction à l'émbryology moléculaire.* Ed. Masson, et C-ie Paris, 1974.

Busch, H. and Smetana, K. *The Nucleolus.* Acad. Press, N.Y., 1970.

Davidson, E. *Gene activity in early development.* Acad. Press, N.Y., 1969.

Diculescu, I. și Doina Onicescu. *Biologie celulară.* Editura Academiei R. S. România, București, 1972.

Drăghici, I. *Esența vieții.* Editura Politică, București, 1972.

Dumitru, I., Mayer, S. și Turcu, A. *Biochimie generală.* Editura didactică și pedagogică, București, 1973.

Dumitru, I. și Iordăchescu Dana. *Enzime.* Editura medicală, București, 1974.

Durand, M., Favard, P. *La Cellule.* Coll. Méthodes. Ed. Hermann, Paris, 1967.

Ebert, J. *Interacting systems in development.* Holt, Rinehart, Winston, N.Y., 1965.

Gallien, L. *Différenciation et organogenèse sexualle des métazoaires.* Ed. Masson et C-ie, Paris, 1973.

Gurdon, J. *The control of gene expression in animal development.* Clarendon Press, Oxford, 1974.

Giosan, N., Săulescu, N. *Principii de genetică.* Editura Ceres, București, 1972.

Haggis, G., Michie, D., Muir, A., Roberts, K., Walker, P. *Introducere în biologia moleculară.* Editura Științifică, București, 1968.

Iacob, F. *Logica viului.* Editura Enciclopedică, București, 1972.

Jensen, W. and Park, R. *Cell Ultrastructure.* Wadsworth, California, 1967.

Ionescu-Varo, M. *Biologie celulară.* Editura didactică și pedagogică, București, 1971.

Ingram, V. *Biosynthèse des macromolécules.* Ediscience, Paris, 1970.

Koningsberger, V., Bosch, L. *Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis,* vol. 10. Elsevier, Amsterdam, 1967.

Lehninger, A. *Bioénergétique,* Ediscience, Paris, 1969.

Levine, R. *Génétique.* Ediscience, Paris, 1969.

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Introducere 3

Capitolul 1. *Plasmalema* 16

1.1. Structură și ultrastructură 16
1.1.1. Modele de structură lamelară 17
1.1.2. Modele de structură miceliară 23
1.2. Complementele suprafeței celulare 32
1.2.1. Plasmalema și glicocalixul 32
1.2.2. Microvilii și diferitele tipuri de glicocalix 33
1.2.3. Solidarizarea celulelor 36
1.3. Constituția chimică 39
1.4. Roluri și activități fiziologice 41
1.4.1. Mișcarea și recombinarea suprafețelor celulare 41
1.4.2. Endocitoza 44
1.4.3. Schimburile prin membrană 49
1.4.4. Particularitățile celulare ale permeabilității 55
1.4.5. Teaca de mielină 62
1.4.6. Membrana — suport al antigenelor de suprafață 65
1.4.7. Rolul plasmalemei în morfogeneză 66

Capitolul 2. *Hialoplasma* 69

2.1. Structură și ultrastructură 69
2.1.1. Microtubulii 70
2.1.2. Plasmafilamentele 72
2.1.3. Miofilamentele 72
2.2. Constituția chimică 73
2.2.1. Studiul „in situ“ 73
2.2.2. Izolarea și extracția hialoplasmei 73
2.2.3. Analiza chimică 73
2.3. Roluri și activități fiziologice 74
2.3.1. Întreținerea diferitelor căi metabolice 74
2.3.2. Mișcarea amiboidală 84
2.3.3. Centriolii 87

Capitolul 3. *Mitocondriile și respirația celulară* 98

3.1. Mitocondriile — sediu al producerii de ATP (energie stocată) 98
3.1.1. Structură și ultrastructură 98
3.1.2. Constituția moleculară 101
3.2. Compoziția chimică 103
3.2.1. Izolarea fracțiilor și subfracțiilor mitocondriale 103
3.2.2. Analiza chimică 104
3.3. Roluri și activități fiziologice 105
3.3.1. Legăturile bogate în energie 105
3.3.2. Ciclul Krebs 106
3.3.3. Lanțul respirator mitocondrial 110
3.3.4. Cuplarea respirației mitocondriale cu sinteza ATP 115
3.3.5. Permeabilitatea mitocondriilor 126
3.3.6. Puterea reducătoare a mitocondriilor 127
3.3.7. Sintezele mitocondriale 128
3.4. Biogeneza mitocondriilor 129

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4. *Reticulul endoplasmatic* 131
4.1. Izolarea reticulului endoplasmatic 131
4.2. Roluri și activități fiziologice 131

Capitolul 5. *Ribozomii* 135
5.1. Structură și ultrastructură 135
5.2. Mecanismul biosintezei proteice 139

Capitolul 6. *Aparatul lui Golgi* 143
6.1. Structură și ultrastructură 143
6.2. Compoziția chimică 145
6.3. Roluri și activități fiziologice 146
6.3.1. Reglarea conținutului celular în apă 146
6.3.2. Acumularea de hidrați de carbon 147
6.3.3. Secreția matricei pereților celulari 149
6.3.4. Metabolismul sulfatului 150
6.3.5. Secrețiile solide 150
6.3.6. Translocarea 151
6.4. Originea aparatului lui Golgi 151

Capitolul 7. *Lizozomii* 153
7.1. Structură și ultrastructură 153
7.2. Enzime lizozomale 154
7.2.1. Lizozomii de acumulare enzimatică 155
7.2.2. Vacuolele autolitice 158
7.2.3. Vacuolele digestive 159
7.2.4. Corpii multiveziculați 161
7.2.5. Corpii reziduali 162

Capitolul 8. *Nucleul interfazic* 164
8.1. Formă, volum, raporturi cu citoplasma 164
8.2. Învelișul nuclear 166
8.3. Cromozomii și carioplasma 170
8.4. Nucleolul 175
8.5. Dinamica citochimică a nucleilor 178
8.6. Biologia moleculară a constituenților cromatinei 182
8.7. Reparația cromozomilor 183

Capitolul 9. *Mitoza* 189
9.1. Fazele mitozei 189
9.1.1. Profaza 189
9.1.2. Metafaza 191
9.1.3. Anafaza 195
9.1.4. Telofaza 196
9.2. Energia necesară mitozei 198
9.3. Balanța de calciu 200
9.4. Tipuri de mitoză 203
9.4.1. Criptomitoza cu fusul extranuclear și criptopleuromitoza . . . 205
9.4.2. Criptomitoza cu semifusuri ce depind de centrii cinetici intracitoplasmatici 207
9.4.3. Criptortomitoza 208
9.5. Influența radiațiilor ionizante asupra nucleului 209
9.6. Influența citostaticelor asupra nucleului 211

Capitolul 10. *Ciclul celular* 219
10.1. Măsurarea ciclului celular 220
10.2. Replicarea cromozomilor la eucariotele superioare 222
10.3. Biosinteza acizilor nucleici 226
10.4. Proteinele nucleare și ciclul creșterii celulelor 241
10.5. Factorii care reglează activitatea nucleară 242

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 11. *Creşterea celulară* 246
Capitolul 12. *Citodiferenţierea* 253
12.1. Diferenţierea gameţilor 262
12.2. Semnificaţia „puffing"-ului din cromozomii giganţi ai dipterelor . . 278
12.3. Puffing-urile cromozomilor Y din spermatogeneza drosofilei 285
12.4. Sinteza macromoleculelor proteice, în absenţa nucleului 292
12.5. Activitatea genică în timpul fecundaţiei 292
12.6. Activitatea genică în timpul neurulării 301
12.7 Determinarea — preludiul diferenţierii 304
12.8. Interacţiunile tisulare în cursul organogenezei 307
Bibliografie 316

Coli de tipar : 20
Bun de tipar : Iunie 1976
Tiraj : 4500 80 exp. leg. 1/1 relutex.
Nr. Plan Editură : 5490

Tiparul executat sub cd. 155 la I. P. „Filaret", str. Fabrica de chibrituri nr. 9—11, Bucureşti. Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner